

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR: PROF. DR. MED J. SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die pathophysiologische Rolle von Adipokinen in
peritonealer Flüssigkeit bei Patienten mit Leberzirrhose,
hepatozellulärem Karzinom und Peritonitis

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von Franz Leidl
aus Neumarkt i.d.OPf.

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Reiner Wiest

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt

Tag der mündlichen Prüfung:

10. 05. 2010

Gliederung

1.	Einleitung	1
2.	Hintergrund: Vorstellung der untersuchten Adipokine und deren systemische Bedeutung und Rolle im Fettgewebe	2
2.1.	Fettgewebe und seine Rolle als immunmodulierendes und endokrinologisches Organ	2
2.2.	Leptin – der entscheidende Anstoß in der Adipokinforschung	5
2.3.	Adiponektin - Adipokin zum Schutz vor den Volkskrankheiten Arteriosklerose, koronare Herzerkrankung und Diabetes mellitus Typ-2	7
2.4.	Resistin – Schlüssel im Kampf gegen Insulinresistenz?	11
3.	Material und Methoden	15
3.1.	Akquirierung des Patientenkollektivs	16
3.2.	Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs	16
3.2.1.	Bestimmung von Basisparametern	16
3.2.2.	Unterscheidung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein, Schweregrad und Genese einer Leberzirrhose	17
3.2.2.1.	Diagnostik der Leberzirrhose und Erfassung der Folgeerscheinungen	17
3.2.2.2.	Unterscheidung des Schweregrades der Leberzirrhose	18
3.2.2.3.	Unterscheidung der Ätiologie der Leberzirrhose	19
3.2.3.	Charakterisierung des Aszites	20
3.2.3.1.	Aszites portaler, kardialer, pankreatogener oder anderer Ursache	21
3.2.3.2.	Maligner Aszites und Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne hepatozellulärem Karzinom	22
3.2.4.	Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne Peritonitis	23
3.3.	Aufklärung der Patienten	24
3.4.	Asservierung der Proben	25

3.5.	Adipokinbestimmung _____	26
3.5.1.	ELISA-basierte Messung von Visfatin _____	26
3.5.1.1.	Testprinzip eines Double-Antibody Sandwich ELISA _____	26
3.5.1.2.	Benötigte Materialien und Probenvorbereitungen _____	27
3.5.1.3.	Durchführung des Assay _____	27
3.5.1.4.	Auswertung der ELISA-basierten Messung von Visfatin _____	28
3.5.2.	ELISA-basierte Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin _____	28
3.5.2.1.	Bereitgestellte Materialien und Lösungen für die ELISA-basierte Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin _____	28
3.5.2.2.	Durchführung der ELISA-basierten Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin _____	31
3.5.2.3.	Auswertung der ELISA-basierten Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin _____	32
4.	Ergebnisse _____	32
4.1.	Statistik _____	32
4.2.	Charakterisierung der Studienkohorte _____	33
4.2.1.	Bestimmung der Basisparameter _____	33
4.2.2.	Vorhandensein und Abwesenheit einer Leberzirrhose und Child-Pugh Score _____	34
4.2.3.	Ätiologie der Leberzirrhose _____	34
4.2.4.	Ätiologie des Aszites _____	34
4.2.5.	Vorhandensein oder Abwesenheit einer Peritonitis _____	35
4.3.	Bestimmung der Adipokinkonzentrationen _____	35
4.3.1.	Detektion von Adiponektin in peritonealer Flüssigkeit _____	36
4.3.2.	Detektion von Leptin in peritonealer Flüssigkeit _____	38
4.3.3.	Detektion von Resistin in peritonealer Flüssigkeit _____	38
4.3.4.	Detektion von Visfatin in peritonealer Flüssigkeit _____	40
4.4.	Berechnung der Serum/Aszites-Ration (SAR) für Adipokine _____	41
4.5.	Übersicht über die Kernaussagen des Ergebnisteils _____	43

5.	Diskussion _____	43
6.	Zusammenfassung _____	54
I.	Abkürzungsverzeichnis _____	57
II.	Abbildungsverzeichnis _____	60
III.	Tabellenverzeichnis _____	61
IV.	Literaturverzeichnis _____	62
V.	Danksagung _____	74
VI.	Lebenslauf _____	75

1. Einleitung

„Fettgewebe, ein Übel unserer modernen Überflussgesellschaft?“ Während lange Zeit Fettgewebe als bloßer Energieträger und Thermoregulator, der zu Adipositas, Diabetes mellitus Typ-2 oder Arteriosklerose führt, angesehen wurde, weiß man heute, dass Adipozyten einen unerlässlichen Bestandteil in der Regulation von endokrinologischen, immunologischen oder inflammatorischen Prozessen in unserem Körper darstellen. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden weitere Bestandteile des Fettgewebes entdeckt: die Adipokine! Den Anfang machte das Enzym Lipoprotein Lipase (LPL), das für die Hydrolyse von zirkulierenden Triacylglyceriden zuständig ist, gefolgt von Adipsin Mitte der 80er Jahre, einer Serinprotease und Teil des alternativen Komplementsystems (1). Die bedeutendste Entwicklung, die das Fettgewebe als einen wesentlichen Ort in der Proteinsynthese und damit einhergehenden Signalwegen definierte, stellte jedoch die Entdeckung des Adipokin Leptin durch Friedmann et al. dar (2).

Adipokine wie Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin repräsentieren sezernierte Proteine aus Adipozyten mit potentieller pro-inflammatorischer oder anti-inflammatorischer Funktion und zahlreichen metabolischen Eigenschaften, wie der Regulierung der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten oder Einfluss auf die Insulinempfindlichkeit verschiedener Körperzellen. Jedoch werden Resistin, Leptin und Visfatin nicht nur in Adipozyten, sondern in zahlreichen anderen Organsystemen gebildet. Trayhurn et al. empfehlen jedoch, den Begriff „Adipokine“ lediglich auf sezernierte Proteine, die tatsächlich aus dem Fettgewebe stammen, zu beschränken (3).

Während einerseits detaillierte Studien über die Rolle von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) im Aszites existieren (4), gibt es andererseits keine Daten über die endokrinologische und pro- und anti-inflammatorische Rolle von Adipokinen wie Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin im Aszites. Adipokine könnten durch peritoneales (ommentales), intra-abdominelles Fettgewebe sezerniert werden und damit einen wichtigen Teil, der im Aszites detektierbaren Adipokine darstellen. Gelänge der Nachweis von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit in signifikanten Mengen, könnte man folgern, dass die pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften der Adipokine einen wichtigen Beitrag in der Kontrolle einer intraabdominellen Entzündung leisten könnten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Adipokine als potentielle Markerproteine für eine peritoneale Tumorausbreitung dienen und gegebenenfalls in der Differenzierung der Genese des Aszites beitragen. In diesem Zusammenhang könnten Adipokine ebenfalls in der Differenzierung zwischen entzündlichen versus nicht-entzündlichen Aszites hilfreich sein. Weiterhin könnten omentale Adipokine in der

Pathogenese von Lebererkrankungen wie der nicht-alkoholischen Leberverfettung (NASH) oder der Leberzirrhose eine Rolle spielen, da omentale Adipokine die Leber über die Portalvene direkt erreichen.

Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Adipokine in peritonealer Flüssigkeit nachzuweisen und deren Konzentration mit „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)-basierter Messung zu quantifizieren. Darüberhinaus sollte das potentielle Verhalten dieser Adipokine im Hinblick auf (a) personenbezogene Faktoren (Alter, Geschlecht, BMI), (b) die Genese und Schweregrad der Leberzirrhose und die Genese des Aszites, (c) dem Vorliegen einer Peritonitis bzw. einer Malignität, sowie (d) die Höhe der entsprechenden Serumspiegel untersucht werden. Hierzu wurde die Korrelation von Serum- und Asziteskonzentrationen (Serum/Aszites Ratio – SAR) mit Laborparametern und klinischen Parametern wie dem „Body Mass Index“ (BMI), der zugrundeliegenden Erkrankung, einer lokalen oder systemischen Entzündung oder einer Tumorerkrankung, untersucht.

2. Hintergrund: Vorstellung der untersuchten Adipokine und deren systemische Bedeutung und Rolle im Fettgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden die Adipokine Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin in peritonealer Flüssigkeit, sowie im Serum, nachgewiesen und mit ELISA-basierter Messung quantifiziert. Die Bedeutung dieser Adipokine und deren systemische und pathophysiologische Relevanz, sowie deren Rolle im Fettgewebe soll im Folgenden dargestellt werden.

2.1. Fettgewebe und seine Rolle als immunmodulierendes und endokrinologisches Organ

„Fettgewebe trägt zur angeborenen Abwehr und zur Entwicklung und Modulation von Entzündungsprozessen bei“ – dieses Konzept einer immunmodulierenden und inflammatorischen Rolle des Fettgewebes wurden von Spiegelmann et al. in den 90er Jahren erstmals vorgestellt (5). Es wurde ermittelt, dass 3T3-L1 Präadipozyten, die sich gerade in der Differenzierung befanden, erhöhte Werte an verschiedenen komplementären Proteinen aufwiesen und zahlreiche Komponenten des angeborenen Immunsystems exprimierten (5). In der Pionierarbeit von Pond et al. wurde eine Verbindung zwischen Fettgewebe und Immunantwort nachgewiesen (6). Heute gilt es

als weitreichend akzeptiert, dass humanes Fettgewebe sowohl ein endokrines (7), als auch ein immunologisches Organ (8) darstellt, und damit seine Rolle als bloßer Energieträger längst verlassen hat.

Fettgewebe besteht aus Adipozyten und einem stromal-vaskulärem Gewebe mit Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Präadipozyten (9;10). Vorläuferzellen der Präadipozyten sind multipotente Stammzellen mesodermalen Ursprungs. Das Potential neue Fettzellen zu generieren besteht während dem ganzen Leben (9;10). Die klassischen Aufgaben des Fettgewebes sind die Wärmeisolierung und Thermoregulation, sowie die Speicherung von freien Fettsäuren nach Nahrungsaufnahme und die Freisetzung von freien Fettsäuren während Hungerphasen, um einen suffizienten Energiehaushalt zu gewährleisten. Während der postprandialen Phase werden freie Fettsäuren aus dem Blut ins Fettgewebe durch LPL aufgenommen. Zuvor kommt es zur Hydrolyse der Triglyceride durch „very-low-density lipoprotein-cholesterol“ (VLDL-c), Chylomikronen und ihren Abbauprodukten, den sogenannten Remnants. Die Mobilisierung der Fettreserven durch Hydrolyse von Triacylglyceriden geschieht durch die „Hormon sensitive Lipase“ (HSL). Insulin ist ein potenter Hemmer der HSL und ebenso ein wichtiger Aktivator der LPL, so dass Insulin eine bedeutende regulatorische Komponente zukommt (10).

Es mehren sich die Daten, dass Fettgewebe nicht nur zur Immunantwort beiträgt, sondern das Fettleibigkeit selbst eine unterschwellige chronische Entzündung der weißen Adipozyten und dessen stromal-vaskulären Gewebe darstellt (5;10;11). Vergleicht man das Fettgewebe von normalgewichtigen mit fettleibigen Personen, fallen histologische Unterschiede auf (12). Diese beziehen sich dabei nicht auf die Adipozyten selbst, sondern auf das umgebende Gewebe der Adipozyten (12). Durch eine „Cluster of differentiation“ (CD)68 Immunfärbung können infiltrierende Makrophagen nachgewiesen werden (12). In verstärktem Maße begegnet man bei fettleibigen Personen, sowohl im stromal-vaskulären Gewebe in der Umgebung der Adipozyten, als auch in fibrös verbindenden Gewebsepten, vermehrt Makrophagen (10;13;14). Zudem können mehr Kapillaren, kleine Gefäße und Endothelzellen bei fettleibigen Personen im Unterschied zu schlanken Personen festgestellt werden. Dies kann mit einer Immunfärbung für CD31, die die Intima von kleinen Gefäßen und Endothelzellen färbt, gezeigt werden (12). Abbildung 1 fasst diese Beobachtungen graphisch zusammen.

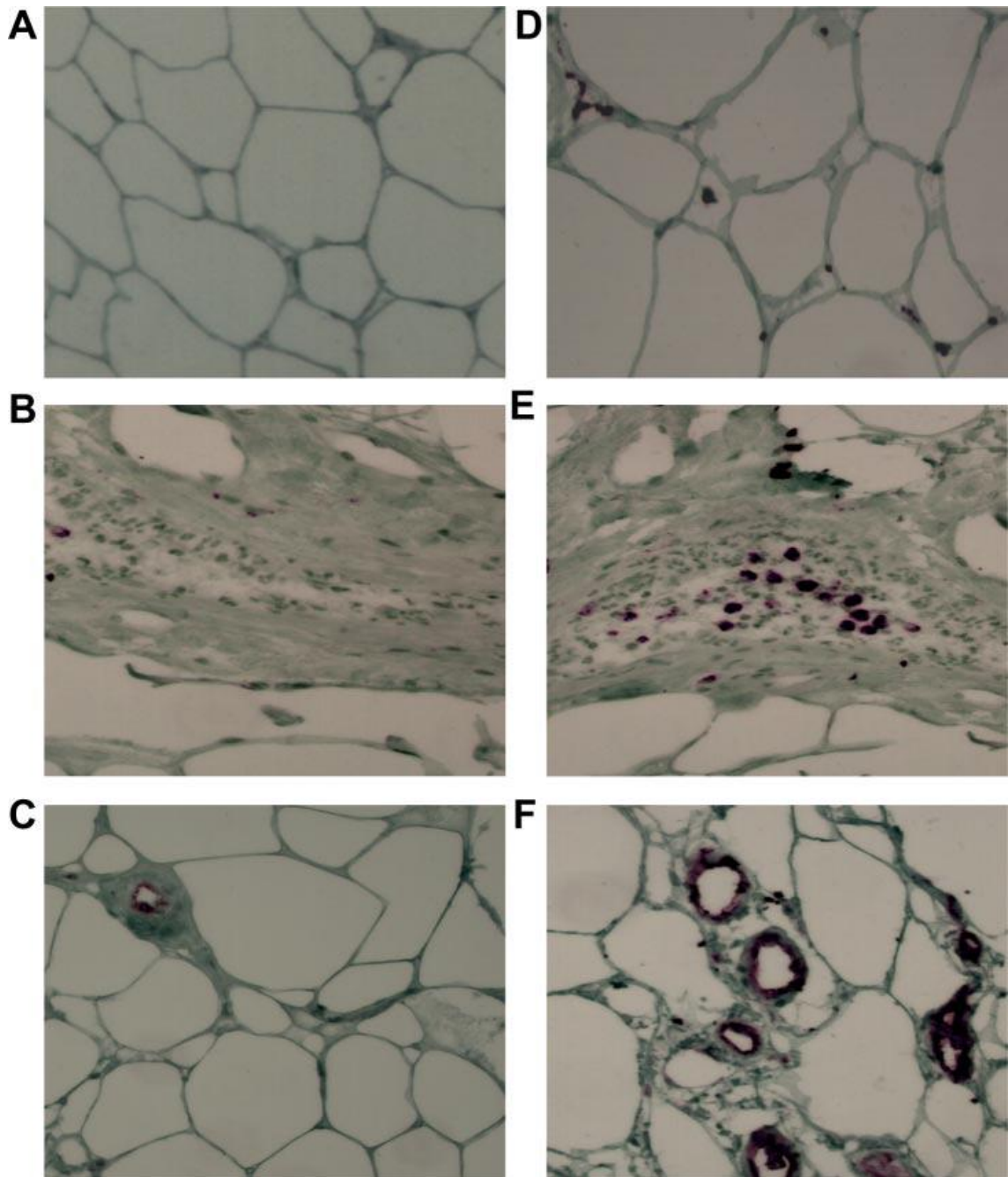


Abb. 1: Vergleich von Fettgewebe einer normalgewichtigen Person (BMI 24 kg/m² – A-C) und einer fettleibigen Person (BMI 43 kg/m² D-F). Immunfärbung CD68 (A, B und D, E) detektiert Makrophagen bei fettleibigen Personen in größerem Ausmaß. Die stromale Umgebung der Adipozyten (A und D) und fibrös verbindende Gewebssepten (B und E) sind bei der fettleibigen Person deutlich prominenter. Die Immunfärbung CD31 (C und F) zeigt den Unterschied in der Anfärbung von endothelialelem und vaskulärem Gewebe und deren verstärkte Ausprägung bei fettleibigen Personen.

Die funktionelle Pleiotropie des Fettgewebes liegt in seiner Synthetisierungs- und Sekretionsfähigkeit von zahlreichen Enzymen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Komplementfaktoren und seinen Matrix- und Membranproteinen, die als Adipokine zusammengefasst werden (15). Inflammatorische Prozesse können dabei zu einer Zytokin-vermittelten Angiogenese führen (12). Gleichzeitig exprimiert das weiße Fettgewebe Rezeptoren für die meisten von diesen Faktoren und ermöglicht somit eine weitreichende Kommunikation innerhalb der Adipozyten, mit anderen Organsystemen, wie Skelettmuskel (16) oder Nebennieren (17), oder als Antwort auf metabolische Veränderungen und externe Stimuli (15). Neben der Angiogenese und der vaskulären Homöostase erfüllt Fettgewebe weitere Funktionen in der Reproduktion, Apoptose, Blutdruckregulierung, Atherogenese, sowie in Koagulationsprozessen und fibrinolytischen Vorgängen (15). Dabei kommt dem Fettgewebe ebenfalls eine wichtige Rolle bei verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen zu, wie einer akut nekrotisierenden Pankreatitis (18;19), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (18;20), sklerosierender Mesenteritis (18;20) oder der nicht-alkoholischen Leberverfettung (NASH) (21).

2.2 Leptin – der entscheidende Anstoß in der Adipokinforschung

Leptin ist ein Proteohormon, das 1994 durch Friedmann et al. entdeckt wurde und damit den entscheidenden Anstoß für weiterführende Forschungen im Bereich der Adipokine lieferte. Bei der Untersuchung von massiv übergewichtigen Mäusen wurde das sogenannte *Ob* (*lep*) Gen (ob für „obese“, *lep* für „leptin“) auf Chromosom 6 (beim Menschen auf Chromosom 7) identifiziert (2). Leptin kommt aus dem griechischen „*leptos*“ und bedeutet „dünn“.

Leptin wirkt am Gehirn und in peripheren Organen, um die Energiehomöostase auf neuroendokriner Ebene zu regulieren (22) und gilt als ein Appetitzügler. Dies beruht auf folgenden Pathomechanismen. Leptinrezeptoren konnten in zwei unterschiedlichen neuronalen Kerngebieten, dem Nukleus arcuatus und dem Nukleus paraventricularis, beide dem Hypothalamus zugehörig, identifiziert werden. In diesen beiden Kerngebieten sorgen Neurone für die Produktion des Agouti-related Protein (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY), die beide appetitstimulierende Funktionen besitzen. Leptin wirkt an diesen Neuronen als Antagonist. Andererseits existieren Neurone, die durch die Produktion der Transmitterstoffe "Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript" (CART) und Proopiomelanocortin (POMC) appetitzügelnd wirken. Leptin wirkt hier als Agonist (23).

Leptin steht im Rahmen der Gewichts- und Körperfettregulierung in engen Zusammenhang mit Insulin. Die Nahrungsaufnahme von Glukose induziert die Ausschüttung von Insulin. Insulin wiederum sorgt für die Synthese und den Einbau von Lipiden und Fettsäuren in die Zelle (Lipogenese). Eine Vermehrung der Fettspeicher führt zur gesteigerten Produktion von Leptin, das durch Hemmung von AgrP und NPY das Hungergefühl reduziert. Leptin aktiviert sympathische Signalwege mit der initialen Ausschüttung von Norephrinephrin und deren weiteren Spaltung und kann somit zum Abbau von Fettsäuren und Lipiden aus körpereigenen Fettspeichern (Lipolyse) sorgen (24). Abbildung 2 fasst diese Vorgänge zusammen.

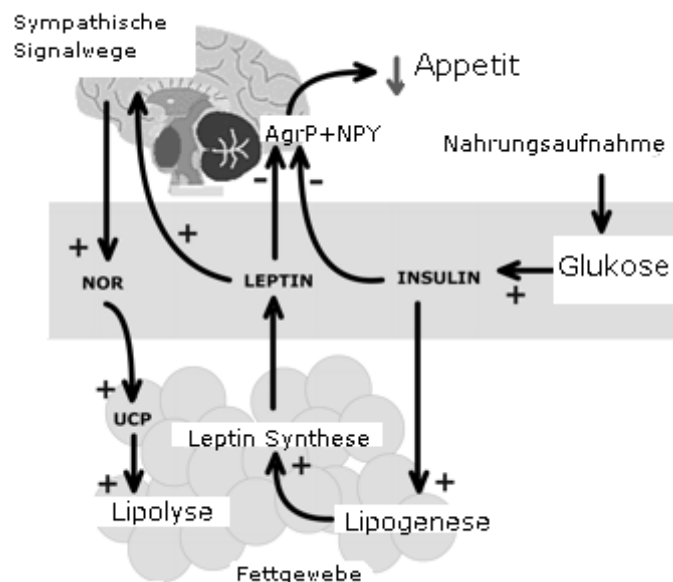


Abb. 2: Zusammenspiel und Regulierung von Lipolyse und Lipogenese durch Insulin und Leptin.

Auf der einen Seite stimulieren niedrige Leptinkonzentrationen während Fastenperioden das Hungergefühl, vermindern den Energieverbrauch und modulieren neuroendokrine und immunologische Funktionen, um Energiereserven zu konservieren. Auf der anderen Seite beugen steigende Leptinkonzentrationen weiterer Gewichtszunahme vor, indem das Hungergefühl reduziert und der Energieverbrauch erhöht wird. Leptin kontrolliert ebenfalls den Glukose- und Lipidmetabolismus, indem durch Leptin modulierte Enzyme, wie Adenosin-5'-monophosphat (AMP) - aktivierte Proteinkinase und Stearoyl-Coenzym-A Desaturase-1 (SCD1), mit der Leber und dem Skelettmuskel direkt interagieren (25). Insgesamt reagiert das System der

Energieregulierung über Leptin sensibler auf den Reiz „Hunger“. Eine "Very low calory diet" (VLCD) oder vollständiges Fasten mindert die Leptinkonzentrationen merklich (26-28). Bei erhöhter Nahrungsaufnahme steigen die Leptinkonzentrationen dagegen nur wenig an (29).

Die Entdeckung von Leptin weckte die Hoffnung Fettleibigkeit hormonell mit Leptin behandeln zu können. Jedoch wurde festgestellt, dass gerade übergewichtige Personen einen hohen Leptinspiegel besitzen. Ursächlich dafür ist eine Leptinresistenz. In diesem Zustand unterbleibt die physiologische Wirkung des Leptins auf die Zielneuronen (30-33). Jedoch ist die Behandlung von meist massiv übergewichtigen Personen mit homozygoter Mutation des Leptingens erfolgreich (34).

Leptin wird im reifen Adipozyten exprimiert und pulsatil freigesetzt. Dabei folgt es einem zirkadianen Rhythmus (35). Weitere Orte, die Leptin herstellen können, sind die Plazenta, der Magen, möglicherweise das Gehirn, die Brustdrüse oder das Intestinum (36). Es spielt daher in zahlreichen Organen oder physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. In der fetalen Lunge induziert eine Leptinausschüttung aus alveolären interstitiellen Fibroblasten eine Surfactantproduktion in Pneumozyten II (37). Es kann die T-Zell-Aktivität im Immunsystem im Mausmodell modulieren (38) oder bei der Entwicklung eines polyzystischen Ovars (39) oder der Hyperemesis gravidarum mitwirken (40). Die Entdeckung des Obesity (*ob*)-Gens und seines Genprodukts Leptin gab dem Leptinrezeptor den Namen „Obese Rezeptor“ (Ob-R). Es wurden die Leptin Rezeptorisomere LRA-LRe identifiziert (33;36;41;42). Die beiden wichtigsten Rezeptoren sind der kurze Leptintransporter LRA und der lange Leptintransporter LRB. LRA wird im Endothel von Gehirnkapillaren exprimiert und ist für den Leptintransport zuständig (41). LRB kommt ausschließlich im Hypothalamus, Hirnstamm und Schlüsselregionen des Gehirns vor, die für die Kontrolle von Nahrungsaufnahme, Fett- und Kohlenhydratmetabolismus und neuroendokrinem System verantwortlich sind (41;42).

2.3. Adiponektin - Adipokin zum Schutz vor den Volkskrankheiten Arteriosklerose, koronare Herzerkrankung und Diabetes mellitus Typ-2

Adiponektin, ebenso bekannt unter dem Namen "Gelatin binding protein 28" (Gbp 28), "adipose most abundant transcript 1" (apM1), "adipozyt complement-related protein 30" (Acrp30) oder AdipoQ wird ausschließlich in Adipozyten produziert und wurde erstmals 1995 beschrieben (43;44). Es macht im Serum etwa 0,01% der Plasmaproteine mit

einer Konzentration von 5-10 µg/ml aus. Die Serumkonzentrationen sind bei Frauen um etwa 15% höher als bei Männern (43;45). Eine Verbindung zwischen niedrigen Adiponektinkonzentrationen und dem Bestehen einer Insulinresistenz, eines Diabetes mellitus Typ-2 und kardiovaskulären Erkrankungen konnte beim Menschen gezeigt werden, ferner wurden vasoprotektive und anti-inflammatorische Effekte des Adiponektins beschrieben (46-48). Die systemischen Wirkungen von Adiponektin sind in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt.

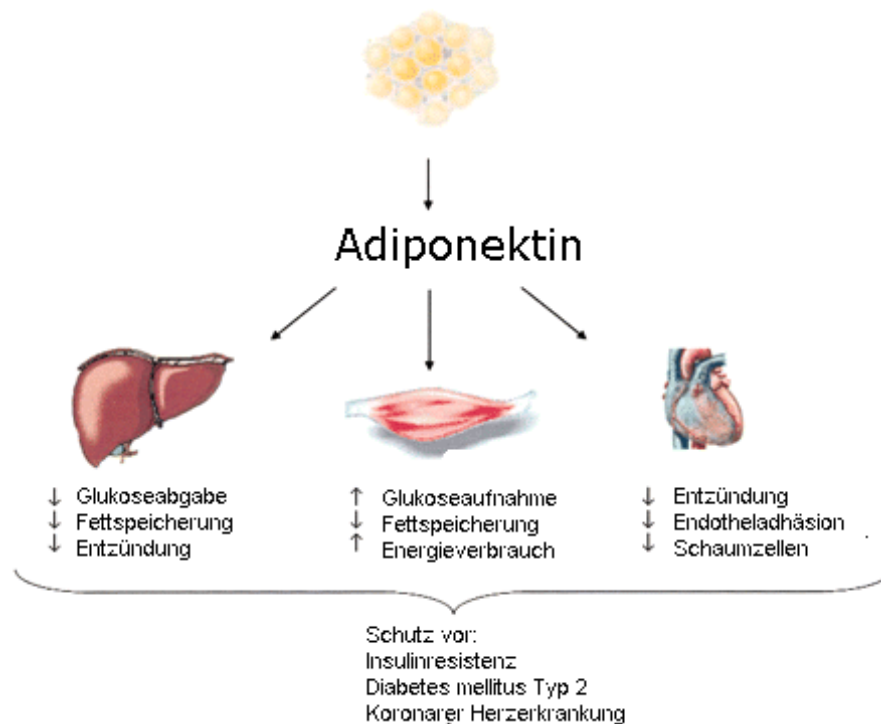


Abb. 3: Systemische Wirkungen von Adiponektin

Eine Gewichtsabnahme, ebenso wie eine Verbesserung des Blutzuckers durch verringerte Kalorienzufuhr, haben in zahlreichen Studien die Erkenntnis erbracht, dass sich Adiponektinkonzentrationen wieder erhöhen können. Hierdurch lässt sich auf eine intensive Verbindung zwischen Adiponektin und metabolischer Kontrolle schließen (49). Die Progression und Entwicklung des sogenannten metabolischen Syndroms wurden mit Polymorphismen am genetischen Locus für die Adiponektinexpression assoziiert (49). Dies deutet darauf hin, dass eine alternierende Expression oder Aktivität von Adiponektin die Ursache der Entwicklung dieses Syndroms darstellt (50). Die Hypothese, dass Adiponektin mit der Entwicklung des metabolischen Syndroms verbunden ist, wurde zuerst von Matsuzawa et al. aufgestellt (50;51).

Adiponektin besteht beim Menschen aus 244 Aminosäuren. Bei der Maus sind es 247 Aminosäuren. Es besitzt ein N-terminales Ende, eine kollagenähnliche Struktur und eine C-terminale globuläre Domäne. Die C-terminale dreidimensionale Struktur ist der von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sehr ähnlich. Es bestehen Sequenzhomologien mit Typ VIII und Typ X Kollagen, Precerebellin, den Proteinen hib 20, 25 und 27 oder Komplement C1q (52).

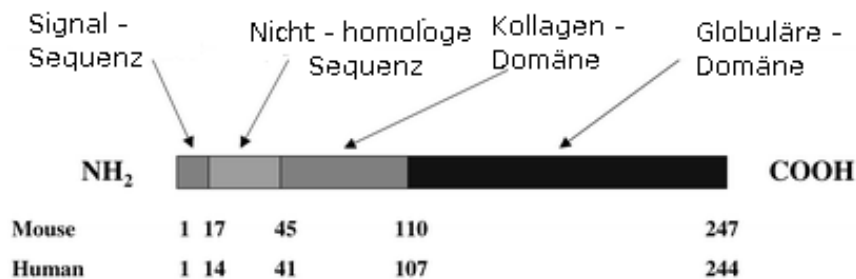


Abb. 4: Das Protein des Adiponektin, bestehend aus vier Domänen (mit den jeweils zugehörigen Aminosäuren beim Menschen und der Maus).

Verschiedene Umstände sind mit erhöhten Adiponektinkonzentrationen assoziiert und könnten die Bedeutung von Adiponektin in metabolischen Prozessen erweitern. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz besitzen erhöhte Werte für Entzündungsparameter oder Marker für eine endotheliale Aktivierung. Diese Patienten haben ebenso erhöhte Adiponektinkonzentrationen. Dies ist umso mehr von Bedeutung, wenn man die pathophysiologische Verbindung von Diabetes mellitus Typ-2 und Nierenversagen betrachtet. Man nimmt eine kompensatorisch, protektive Erhöhung von Adiponektinkonzentrationen an, obwohl noch unklar ist, ob dieser Mechanismus durch eine erhöhte Produktion an Adiponektin, oder eine reduzierte Clearance zustande kommt (50). Im Mausmodell, in welchem die Kollagendomäne von Adiponektin in vivo unter der Kontrolle eines Adipozyten-spezifischen Promotors überexprimiert werden kann, und damit zu deutlich erhöhten Adiponektinkonzentrationen im Serum führt, konnte beispielsweise die Entwicklung eines Exophthalmus oder einer Fettverteilungsstörung, wie interskapuläre Fettkissen, festgestellt werden (53).

Die wichtigsten Funktionen des Adiponektin, als Unterdrücker der Glukoneogenese und Verstärker der Lipidoxidation, werden zu einem großen Teil durch die Aktivierung von

"AMP-activated protein kinase" (AMPK) und Inaktivierung von "Acetyl-CoA carboxylase" (ACC) in der Leber und im Muskel gesteuert. Der anti-inflammatorische Effekt des Adiponektin ist dagegen mit der Unterdrückung von Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) und vaskulären Adhäsionsmolekülen assoziiert (25;54). Adiponektin führt, vermittelt durch jeweils zwei sieben-Transmembran-Domänen enthaltende Proteine, Adipo-R1 und Adipo-R2, zu einem Signal, das die AMPK Phosphorylierung und Aktivierung induziert (25;54). Es scheint, dass Adipo-R1 und Adipo-R2 unterschiedliche metabolische Rollen vertreten. Ein Adipo-R1 Defizit vermindert den Energieverbrauch, erhöht den Körperfettanteil und induziert Insulinresistenz. Auf der anderen Seite führt ein Adipo-R2 Defizit zu höherem Energieverbrauch, einem schlanken Habitus, einem reduzierten Plasma-Cholesterol und zu erhöhten Glukosekonzentrationen (25). Ein wichtiger Rezeptor für die Adiponektinbindung ist zudem der sogenannte T-cadherin Rezeptor, ein oberflächlicher Rezeptor an endothelialen und glatten Muskelzellen. Dieser ist involviert in Kalzium gesteuerten Signalwegen und bindet mit hoher Affinität "high molekular weight" (HMW) Formen des Adiponektin. Dieser wird deshalb als ein Co-rezeptor der Adiponektinbindung betrachtet (55).

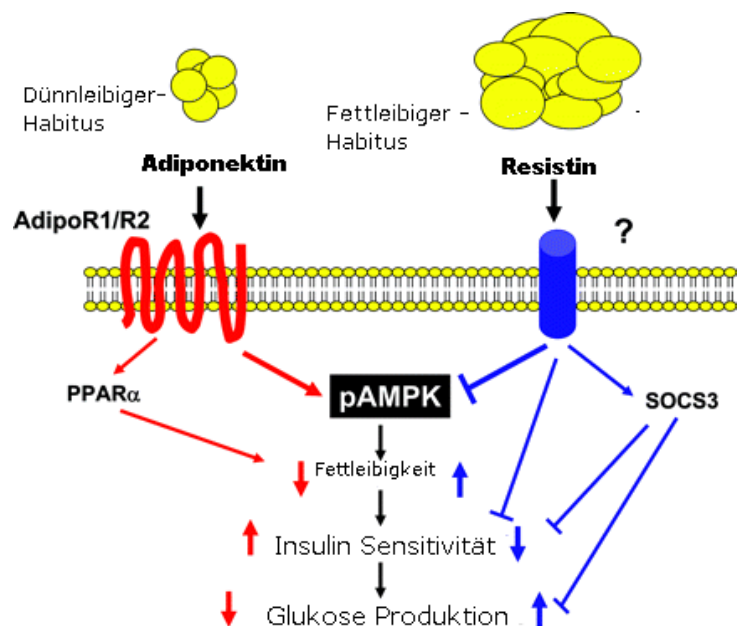


Abb. 5: Adiponektin und Resistin Signalweg in der Leber. Hohe Adiponektin Konzentrationen bei Personen mit schlankem Habitus binden an Adipo-R1 und -R2 in der Leber. Dies führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von AMPK und erhöhten peroxisomal proliferierenden aktivierenden Rezeptor- α (PPAR- α) Aktivität. Adiponektin stimuliert die Fettsäureoxidation, beugt Fettleibigkeit vor, verstärkt den Insulinsignalweg und supprimiert die hepatische Glukose

Produktion. Resistin ist bei Fettleibigkeit erhöht, inhibiert AMPK Aktivität, erhöht „suppressor of cytokine signaling 3“ (SOCS3) und induziert Insulinresistenz.

2.4. Resistin – Schlüssel im Kampf gegen Insulinresistenz?

Resistin ist ein Hormon, das 2001 von der Gruppe um Dr. Mitchell A. Lazar an der Universität Pennsylvania identifiziert wurde (56). Das 12,5 kDa schwere Peptidhormon wurde als „Resistin“ bezeichnet, da es bei Mäusen eine Insulinresistenz erzeugte (56). Resistin kann in den verschiedensten Organen, wie Fettgewebe, Hypothalamus, Nebenniere, Milz, Skelettmuskel, Pankreas, Gastrointestinal-Trakt, Knochenmark und Lunge detektiert werden (57-60). Obwohl die Synthese des Resistin in Mäusen auf Adipozyten beschränkt zu sein scheint, kann der Mensch dieses Protein in Adipozyten, Muskelzellen, Zellen des Pankreas, wie auch in mononukleären Zellen wie Makrophagen (57;58;60), Langerhans-Zellen und Präadipozyten (59) synthetisieren. Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Genexprimierung von Resistin, in mononukleären Blutzellen deutlich höher ist, als in Adipozyten. Jedoch sind vergleichende Daten zu Proteinkonzentrationen noch nicht verfügbar. So bleibt die Frage noch offen, welcher Zelltyp beim Menschen hauptsächlich für die systemische Produktion und für die hohen zirkulierenden Konzentrationen von Resistin verantwortlich ist (57;58;60).

Mit der Entdeckung des Resistin sollte der augenscheinliche Zusammenhang zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ-2 ein hormonelles Korrelat finden. In der Originalarbeit wurde Resistin als ein Hormon beschrieben, das im Fettgewebe produziert und abgegeben wird und zur Resistenzentwicklung gegenüber Insulin beiträgt. Zahlreiche Studien demonstrierten in der Folge, dass die Resistinkonzentrationen im Serum mit zunehmender Fettleibigkeit in unterschiedlichen Modellen (Mensch, Ratte, Mäuse) ansteigen (59;61;62). Weiter wurde die Hypothese, dass erhöhte Resistin Konzentrationen zu einer erhöhten Insulinresistenz führen, in weiteren Forschungsarbeiten bestätigt (62-64). In Abbildung 6 können folgende pathophysiologische Mechanismen und Ergebnisse zusammengefasst werden.

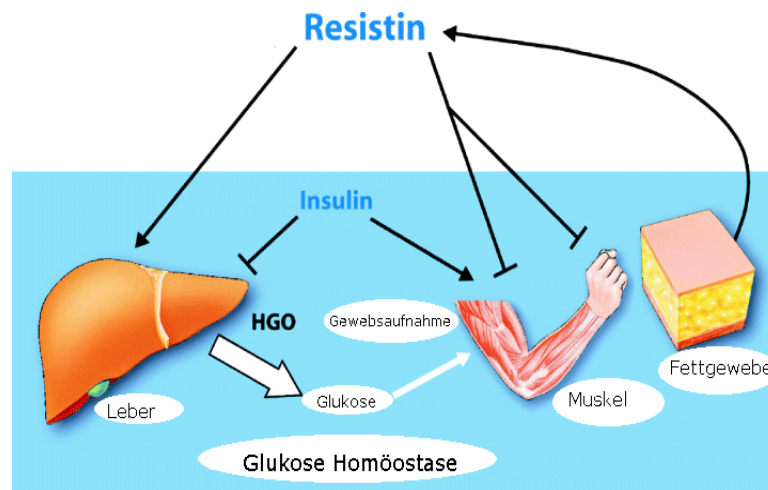


Abb. 6: Vermutete systemische Wirkung von Resistin. Es wurde demonstriert, dass Resistin die Glukose Homöostase und Insulinaktivität im Mausmodell beeinflusst. Nach dieser Annahme kann Resistin den Effekt von Insulin antagonisieren. Dieser Antagonismus resultiert als Antwort auf eine Insulinresistenz in einer verminderten Unterdrückung des hepatischen Glukoseoutputs (HGO) und einer verminderten Fähigkeit des Skelettmuskels und Fettgewebes Glucose aufzunehmen. Beides führt zu einer erhöhten Glukosekonzentration im Blut.

Die Theorie, dass Resistin ein Bindeglied zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ-2 darstellt, ist wissenschaftlich weit erörtert, jedoch kann eine steigende Anzahl an Arbeiten diese Annahme beim menschlichen Organismus nicht bestätigen. Es wurden signifikant erniedrigte Resistinkonzentrationen mit steigender Adipositas gefunden (65-67) und die Verlinkungstheorie zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ-2 wurde in mehreren Arbeiten nicht nachgewiesen (58;68;69). Zudem konnte die experimentelle Annahme im Tiermodell, dass Resistin hauptsächlich im weißen Fettgewebe produziert wird, beim Menschen nicht bestätigt werden (58;60). Aus diesem Grund gilt es als unwahrscheinlich, dass Resistin als der primäre Schlüssel in der Beziehung zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ-2 in Zukunft angesehen werden kann. Dennoch kann angenommen werden, dass Resistin eine noch nicht vollständig aufgeklärte Rolle im humanen Energiestoffwechsel einnimmt. Der Resistin Rezeptor ist nicht bekannt, aber der mögliche Effekt, eine Insulin Resistenz erzeugen zu können, ist mit einer Verminderung der AMPK Phosphorylierung und erhöhter SOCS3 Expression verbunden (siehe Abbildung 5) (25;70-72). Es scheint, dass Resistin an ähnlichen Zielen wie Leptin und Adiponektin in den Glukosemetabolismus eingreift.

Resistin und Adiponektin haben zudem reziproke Effekte auf Gefäßendothelzellen. Resistin induziert die Expression von „vascular cell-adhesion molecule 1“ (VCAM-1), „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) und Pentraxin-3, während Adiponektin auf der anderen Seite die Expression dieser Moleküle vermindert (60;73). Die Bildung intrazellulärer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1, die am chemotaktischen Weg der Leukozytenrekrutierung partizipieren (74), demonstriert die Involvierung von Resistin in inflammatorische Prozesse (75;76). Es hat sich weiter gezeigt, dass Resistin zu einer erhöhten Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-1, TNF- α in einer Nuklearfaktor- κ B (NF κ B) modifizierten Form, IL-6 und IL-12 führen kann (77). Resistin wird wiederum durch Interleukine oder mikrobiologische Agenzien wie Lipopolysacharide, die von Leukozyten erkannt werden, vermehrt exprimiert (78). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Resistin in entzündeten Gelenken bei Patienten mit rheumatoider Arthritis akkumuliert und die Konzentrationen mit verschiedenen Entzündungsmarkern korrelieren (58;60). Erhöhte Konzentrationen an Resistin bei chronischen Nierenerkrankungen sind mit beeinträchtigter Nierenfunktion und Entzündung, aber nicht mit einer Insulinresistenz assoziiert (79).

Zusammenfassend stellt Resistin ein Protein dar, das viele Eigenschaften eines pro-inflammatorischen Zytokins besitzt und möglicherweise eine nicht unerhebliche Rolle bei entzündlichen Erkrankungen, mit oder ohne Verbindung zu einer Insulinresistenz, spielt. Der Nachweis der pro-inflammatorischen Effekte basiert jedoch noch auf einer kleinen Anzahl an Studien, so dass mehr Informationen benötigt werden, die die Funktion des Resistin in seiner Gesamtheit in Tierversuchen und beim Menschen aufklären.

2.5. Visfatin - Adipokin der Zukunft?

Visfatin wurde ursprünglich als ein mutmaßliches Zytokin geklont, das die Reifung von Vorläuferzellen der B-Zell Reihe in der Anwesenheit von IL-7 beschleunigt. Es wurde deshalb als „Pre-B-cell colony-enhancing factor“ (PBEF) bezeichnet (80). Als das Gen, das für die „bakterielle nicotinamide phosphoribosyltransferase“ (nadV) kodiert, in *Hamophilus ducreyi* als erstes isoliert wurde, fand man heraus, dass es signifikante Homologien zum PBEF Gen aufwies (81). Rongevaux et al. demonstrierten, dass das Maus PBEF-Gen „nicotinamide phosphoribosyltransferase“ (NAMPT) enzymatische Aktivität besitzt und „nicotinamid adenine dinucleotide“ (NAD) unabhängiges

Wachstum von Bakterien, die *nadV* nicht besitzen, erzeugt (82). Revollo et al. bestätigten biochemisch, dass das Maus PBEF Genprodukt, das für NAMPT Enzym kodiert, fähig ist, intrazelluläre NAD Konzentrationen zu modulieren (83). Andere Arbeiten konnten dies bestätigen (84). Weiter haben mehrere Arbeitsgruppen beschrieben, dass es sich um ein Enzym mit einer dimeren Typ-2 Phosphoribosyltransferaseaktivität handelt, das an der NAD Biosynthese beteiligt ist (85-87). Fukuhura et al. fanden heraus, dass das PBEF-Gen, von dem bekannt war, dass es im Knochenmark, Leber und Skelettmuskel exprimiert wird, in großen Mengen im viszeralen Fett vorkommt und gaben dem Protein den Namen Visfatin (88;89).

Für Visfatin besteht vermutlich eine direkte Beziehung zwischen seiner Plasmakonzentration und dem Bestehen eines Diabetes mellitus Typ-2. Visfatin bindet an den Insulinrezeptor und verursacht eine Hypoglykämie, indem es die hepatische Glukoneogenese und die Freisetzung von Glukose aus der Leber hemmt und die Glukoseverwertung in Adipozyten und Monozyten verstärkt (90). Bei einem schlanken Habitus ist die Visfatinproduktion niedrig und die Beeinflussung des Insulinsignalweges gering. Dagegen führt Fettleibigkeit mit hohem viszeralen Fettanteil zu erhöhter Visfatinproduktion und steigert simultan eine weitere Gewichtszunahme und verstärkt die Insulinwirkung an peripheren Organen (91). Dennoch ist die Evidenz einer direkten Beziehung zwischen Visfatin und Diabetes mellitus Typ-2 bisher umstritten (90). Das Hormon befindet sich sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern (90) und besitzt eine autokrine, parakrine und endokrine Funktion (91). Die metabolischen Wirkungen von Visfatin sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

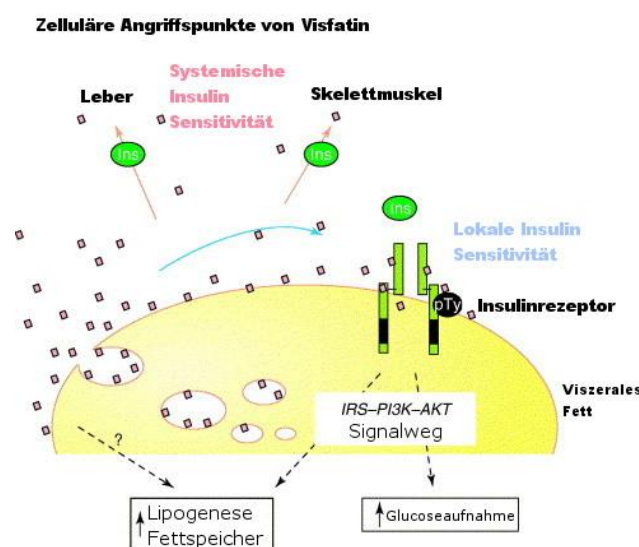


Abb. 7: Systemische und lokale Wirkungen des Visfatin

Das Visfatin Gen hat sich in der Evolution gut erhalten. Das Protein beim Hund ist mit dem menschlichen zu 96% identisch. Verglichen mit Nagetieren besteht eine Übereinstimmung von 94% (90). Visfatin wird bei Hypoxie, Entzündung und Hyperglykämie verstärkt gebildet und die Produktion wird durch Insulin, Somatostatin und Statine vermindert (90). Das Hormon wurde in zahlreichen Geweben identifiziert. Neben dem viszeralen Fettgewebe kommt es im Gehirn, den Nieren, der Lunge, der Milz und dem Hoden vor (90). Visfatin wurde dabei mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie einer akuten Pneumonie oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (92), sowie Sepsis, rheumatoide Arthritis und Myokardinfarkt (93) in Zusammenhang gebracht.

3. Material und Methoden

Im Folgenden soll eine Zusammenfassung über die klinische Charakterisierung und Erfassung des Patientenkollektivs, sowie der Probengewinnung und der Probenauswertung gegeben werden.

3.1. Akquirierung des Patientenkollektivs

Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I (Station 10, 14, 15, 92) und Innere Medizin II (Station 93), sowie der Klinik und Poliklinik für Hämatologie/Onkologie (Station 20) und Strahlentherapie (Station 12) der Universität Regensburg nahmen im Zeitraum vom 09.11.2006 bis 06.04.2008 an der Studie teil. Im Rahmen der klinisch prospektiv angelegten Studie wurde bei 128 Patienten mit per Ultraschall oder Computertomographie nachgewiesenem Aszites eine Parazentese durchgeführt.

Einschlusskriterien waren die Detektion des Aszites unabhängig von der zugrundeliegenden Genese des Aszites, klinische Notwendigkeit einer Parazentese, Einverständniserklärung des Patienten und Alter zwischen 18-85 Jahren. Ausschlusskriterien beinhalteten das Bestehen einer Schwangerschaft, Notwendigkeit einer Peritonealdialyse und Zustand nach (Z.n.) bauchchirurgischen Eingriffen innerhalb der letzten drei Monate vor Studienteilnahme. Von den 128 Patienten, bei denen eine Parazentese durchgeführt wurde, erfüllten 96 Patienten die Kriterien. Davon wurde bei 79 Patienten simultan Serumblut abgenommen.

3.2. Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs

Jeder Patient wurde vor und nach der Parazentese einem mehrtägigen Studienfollow-up unterzogen. Dabei wurden die Vorgeschichte und die klinische Präsentation des Patienten, diagnostische Befunde und therapeutische Maßnahmen dokumentiert.

Tab. 1: Charakterisierung der Studienkohorte

Untersuchungscharakteristika Studienkohorte (96 Patienten)	
Geschlecht	<i>Ursache des Aszites:</i>
BMI kg/m ² (mean ± SEM)	Portale Genese n (%)
Alter (mean ± SEM)	Maligne Genese n (%)
Bestehen einer Leberzirrhose	Kardiale Genese n (%)
Schweregrad der Leberzirrhose (nach Child-Pugh A-C)	Pankreas-assoziierte Genese n (%)
<i>Ursache der Leberzirrhose:</i>	Andere Genese n (%)
Alkohol n (%)	Vorkommen eines Hepatozellulärem Karzinoms
Chronische Hepatitis B/C n (%)	Vorkommen einer Peritonitis
Andere n (%)	

3.2.1. Bestimmung der Basisparameter

Die Studiengruppe wurde in männliche und weibliche Probanden unterteilt und das mittlere Alter der Studiengruppe errechnet. Von jedem Patient wurden das Körpergewicht (nach Durchführung der Parazentese) und die Körpergröße gemessen, um daraus den BMI in kg/m² zu bestimmen. Die Studiengruppe wurde in zwei Probandengruppen mit einem BMI ≥25 kg/m² und <25 kg/m² unterteilt.

3.2.2. Unterscheidung der Patienten hinsichtlich Vorhandensein, Schweregrad und Genese einer Leberzirrhose

Im Rahmen der Patientencharakterisierung wurde zwischen Patienten mit und ohne Leberzirrhose unterschieden. Eine Charakterisierung der Schwere des Zirrhosegrades wurde mithilfe des CHILD-Pugh-Score getroffen. Bei Patienten mit Leberzirrhose fand eine Unterteilung in alkoholassoziierte Leberzirrhose, Leberzirrhose aufgrund einer viralen Hepatitis B/C Infektion und Leberzirrhose anderer Genese statt.

3.2.2.1. Diagnostik der Leberzirrhose und Erfassung der Folgeerscheinungen

Zur eindeutigen diagnostischen Sicherung einer Leberzirrhose wurde eine histologische Untersuchung durch perkutane Biopsie bei denjenigen Patienten angestrebt, die in der Vorgeschichte noch keine histologische oder laparoskopische Abklärung einer Leberzirrhose aufweisen konnten. Bei schweren Blutgerinnungsstörungen oder Aszites musste wegen der Komplikationsgefahr auf die perkutane Leberpunktion verzichtet werden. Hier konnte alternativ der Nachweis indirekter Zeichen in der Bildgebung (Splenomegalie, Aszites oder Kollateralkreisläufe) weiteren Aufschluss geben. Eine transjuguläre Leberbiopsie oder neuere Methoden wie eine Minilaparoskopie zur Diagnose einer Leberzirrhose, unklarer Leberherde oder zur Aszitesdiagnostik, die durch Arbeiten von Denzer und Lohse 1996 zum ersten Mal entwickelt wurden, fanden keine Anwendung (94;95).

Zur Diagnose einer Leberzirrhose wurden zudem klinische Parameter herangezogen. So wurde in der Patientenuntersuchung insbesondere auf Zeichen einer Leberzirrhose, wie Ikterus mit Pruritus und Kratzeffloreszenzen, Spider naevi, Palmar- und Plantarerythem, Weißnägel, Lacklippen, Lackzunge, Dupuytren-Kontrakturen oder dem Nachweis einer portalen Hypertension durch typische Kollateralen geachtet. Zusätzlich wurde bei der Frau eine sekundäre Amenorrhö, beim Mann das Vorliegen einer Hodenatrophie, einer Gynäkomastie, eines Potenzverlusts und ein Abnehmen der Sekundärbehaarung erfasst. Die initiale Labordiagnostik zur Diagnose und Schweregradeinteilung einer Leberzirrhose beinhaltete die Bestimmung von Serumtransaminasen, Bilirubin, alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase, Albumin, Kreatinin, Natrium und Blutbild mit Thrombozytenzahl, Quick und INR. Zur Detektion einer Leberzirrhose wurde weiterhin eine sonographische Diagnostik (mit Geräten der Firma Mindray DP 1100 Plus Sonoring, Schmitt-Haverkamp, Hitachi CS9200 Computer Sonograph, und Hitachi EUB 8500) durchgeführt. Im Hinblick auf

die Zirrhosedagnostik beträgt die Sensitivität und Spezifität des hochauflösenden Ultraschalls jeweils etwa 90% (96).

Weiter wurden die Folgen einer Leberzirrhose anhand folgender Parameter bestimmt: Ösophagusvarizen wurden endoskopisch (mit Geräten der Firma Olympus GIFQ 160, GIF 1T140, GIF1TQ160 und Fujinon EG 450 CT5, Fujinon WR530) nachgewiesen. Nach Aussehen und Eigenschaften während der Endoskopie wurde eine Stadieneinteilung in Grad I-IV erhoben. Varizenblutungen und deren Intervention nach Baveno IV Konsensuskriterien von 2005 wurden dabei gesondert dokumentiert. Ein Hepato-renales Syndrom (HRS) wurde gemäß den Richtlinien des „Internationalen Aszites Club“ (97) bestimmt. Nach „Internationalen Aszites Club“ wird ein HRS durch das Vorhandensein von fünf Kriterien (schwere Zirrhose, glomeruläre Hypofiltration, keine anderen funktionellen oder organischen Ursachen, fehlende Plasmavolumenausdehnung, keine Proteinurie) definiert und es kann zwischen einem Typ 1 mit einer rapiden Verschlechterung der Nierenfunktion und einem Typ 2 mit einer langsam progressiven Nierenfunktionseinschränkung unterschieden werden (98). Eine hepatische Enzephalopathie wurde anhand psychomotorischer Symptome und Komatiefe nach klinischer Schwere nach West Haven Kriterien (99;100) eingeordnet. Dabei werden fünf Stadien in Anbetracht der Bewusstseinslage/Intellekt, Verhalten und neuromuskulären Symptomen unterschieden (101). Die Einteilung erfolgte mit Hilfe klinischer Untersuchung des mentalen Status nach Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen.

3.2.2.2. Unterscheidung des Schweregrades der Leberzirrhose

Für die Evaluierung des Schweregrades der Leberzirrhose wurde der Child-Pugh Score herangezogen. Die Child-Pugh-Kriterien wurden 1964 erstmals von Dr. C.G. Child und Dr. J.G. Turcotte (Universität von Michigan) publiziert. Aus diesem Grunde darf auch der Begriff Child-Turcott-Pugh Score synonym gebraucht werden. 1972 wurden die Kriterien von Pugh modifiziert (102). Tabelle 3 fasst die Parameter zusammen, die für die Eingruppierung der Studienpatienten in die jeweilige Child-Pugh Klasse verwendet wurde.

Tab. 2: Mithilfe des Gesamtbilirubin (μM), dem Serumalbumin (g/l), dem INR und der Beurteilung des Vorhandenseins oder dem Grad eines Aszites oder einer hepatischen Enzephalopathie lässt sich ein Punktwert berechnen, der den Patienten in die Child-Pugh Klasse A (5-6 Punkte), B (7-9 Punkte) oder C (≥ 10 Punkte) einteilt. Hiermit kann die Prognose des Patienten abgeschätzt werden.

Child-Pugh-Score			
	A = 1 Punkt	B = 2 Punkte	C = 3 Punkte
Albumin g/l	> 35	28-35	< 28
Bilirubin μM	< 35	35-50	> 50
Prothrombinzeit Sec über der Norm	1-4	4-6	> 6
Aszites	keiner	kontrolliert	gespannt
Enzephalopathie	keine	Grad 1-2	Grad 3-4

3.2.2.3. Unterscheidung der Ätiologie der Leberzirrhose

Die Ätiologie der Leberzirrhose beträgt im westeuropäischen Raum 50% für Alkohol, 40% für virale Erkrankungen und 10% für andere Ursachen (95). In Anlehnung an diese Einteilung wurden die Patienten in die ätiologischen Gruppen „Alkoholische Zirrhose“, „Hepatitis B/C“, „Andere“ unterteilt. Tabelle 3a und b fassen die diagnostischen Parameter zusammen, die für die Unterteilung der Patienten in die drei Subpopulationen verantwortlich waren.

Tab. 3a: Studiengruppe 1 + 2 - Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose

	Art der Zirrhose	Diagnostik
Studiengruppe 1	Alkoholische Zirrhose	Anamnese des Alkoholabusus* Histologie
	Hepatitis B	HBsAg und HBeAg, evtl. HBV-DNA
Studiengruppe 2	Hepatitis C	Anti-HCV, HCV-RNA

Tab. 3b: Studiengruppe 3 - Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose

	Art der Zirrhose	Diagnostik
Studiengruppe 3	Andere	
	Primär biliäre Zirrhose	Antimitochondriale Antikörper Subtyp M2, IgM, Histologie
	Primär sklerosierende Cholangitis	ERCP, p ANCA, Rekto-Koloskopie, evtl. Histologie
	Autoimmunhepatitis	Hypergammaglobulinämie, IgG, antinukleäre Antikörper, Histologie
	Hämochromatose	Familienanamnese, erhöhte Transferrinsättigung und Ferritin, quantitative Eisenbestimmung im Leberpunktat, Mutationsscreening
	Morbus Wilson	Kupferausscheidung im 24-h-Sammelurin
	Kardiale Zirrhose	Herzultraschall, Ultraschall der Leber
	Nichtalkoholische Steatohepatitis	Histologie, fehlende Alkoholanamnese

*Zur Validitätsüberprüfung- und Strukturierung der Angaben wurde ein Fragebogen zu Alkoholkonsum und Lebensgewohnheiten angefertigt und bei den Studienteilnehmern der verschiedenen Studiengruppen angewandt.

3.2.3. Charakterisierung des Aszites

Aszites wird in etwa 80% - 85% der Fälle durch eine zirrhotische Lebererkrankung hervorgerufen, während Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Pankreatitis, nephrotisches Syndrom oder Tuberkulose eher selten eine Rolle spielen. Bei etwa jedem zehnten Patienten mit Aszites ist eine Krebserkrankung die Ursache. In vier von fünf Fällen sind hierfür Ovarialkarzinome oder gastrointestinale Tumoren verantwortlich, seltener Tumoren der Mamma, Lunge, Uterus und Zervix (103). Tabelle 4 fasst die häufigsten Ursachen zusammen.

Tab. 4: Übersicht über die Entitäten und Ursacheneinteilung peritonealer Flüssigkeit

Ausgewählte Ursachen der Aszitesentwicklung	Häufigkeit in %
Portal (Leberzirrhose, andere Ursachen portaler Hypertonie)	80 – 85
Maligne (Peritonealkarzinose, Tumore der weiblichen Geschlechtsorgane, Gastrointestinale Tumore)	10
Kardial (Rechtsherzversagen, schwere Herzinsuffizienz)	3
Pankreatogen (akute Pankreatitis und Pankreasfisteln)	<1
Entzündlich (bakteriell, tuberkulös)	<1
Biliär (Leckage nach Gallen-OP, Gallenblasen-Ruptur/-Perforation)	<1
Andere (z.B. chylös oder nephrogen)	<1

In Anlehnung an diese Häufigkeitsverteilung wurden die Patienten in die Subgruppen „Portale“, „Maligne“, „Kardiale“, „Pankreatogene“ und „Andere“ Genese des Aszites eingeteilt. Bei der Ursachenfindung und Eingruppierung der Patienten waren Anamnese, klinische Untersuchung, abdominelle Sonographie und gegebenenfalls weitere Bildgebung, sowie klinisch-chemische oder bakteriologische Zusatzuntersuchungen in den meisten Fällen diagnoseweisend. Dennoch spielten insbesondere in der Unterscheidung eines portalen, von einem malignen Aszites klinisch-chemische Parameter im Aszites eine wichtige Rolle in der Differentialdiagnose.

3.2.3.1. Aszites portaler, kardialer, pankreatogener oder anderer Ursache

Den wichtigsten Parameter als Hinweis für eine portale Genese stellte der „Serum-Aszites Albumin Gradient“ SAAG-Wert (Albuminkonzentration im Serum minus Albuminkonzentration im Aszites) dar. Die Bestimmung des SAAG-Wertes ist dabei dem orientierenden Exsudat-Transsudat Konzept in der Differentialdiagnose des Aszites weit überlegen (104). Bei einem SAAG von $>1,1$ g/dl kann bei Ausschluss einer kardialen Ursache mit einer Sensitivität von nahezu 100% und einer Spezifität von etwa 95% von einer portalen Genese des Aszites ausgegangen werden. Ähnlich

sensitiv ist die Bestimmung der Albuminkonzentration im Aszites ($<2,0$ g/dl) bei einer Spezifität von circa 85%. Ergänzende Parameter stellten das Aszites/Serum-Albuminverhältnis ($<0,65$), das Aszites-/Serumeiweißverhältnis und der Aszites-Gesamteiweißgehalt ($<2,5$ g/dl) mit einer Spezifität von 80% und einer Sensitivität von 90% dar. Letztgenannter Parameter spielte in der Unterscheidung eines portalen von einem kardialen Aszites eine besondere Bedeutung.

Während beim kardialen Aszites in der Regel ebenfalls ein SAAG-Wert $>1,1$ g/dl vorliegt, lässt sich im Unterschied zum portalen Aszites in nahezu 100% der Fälle eine Gesamteiweißkonzentration von $>2,5$ g/dl detektieren. Im Gegensatz zur portalen und kardialen Genese des Aszites findet sich in aller Regel bei allen anderen Ursachen eines Aszites ein SAAG-Wert $<1,1$ g/dl. Die pankreatogene Ursache kann weiter durch eine Amylasekonzentration Aszites/Serum > 1 mit hoher Sensitivität und Spezifität bestätigt werden. Diese wurde jedoch nicht standardmäßig durchgeführt (105).

3.2.3.2. Maligner Aszites und Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne Hepatozellulärem Karzinom

Bei Verdacht auf eine maligne Genese des Aszites wurden ein Nachweis von Tumorzellen, sowie die Bestimmung von Tumormarkern (CEA, CA19-9) angestrebt. Beide Methoden sind hochspezifisch, weisen jedoch nur eine Sensitivität von maximal 80% (Zytologie) beziehungsweise 45% (Tumormarker) auf. Es wurde weiterhin der Aszites-Gesamteiweißgehalt (Diskriminationswert $>2,5$ g/dl mit einer Spezifität von 70% und einer Sensitivität von 75%) bestimmt. In Einzelfällen konnte der Aszites-Cholesterinwert (Diskriminationswert >45 mg/dl, Spezifität 70%, Sensitivität 80%) und der Aszites/Serum-LDH-Wert (Diskriminationswert $>1,0$, Spezifität 75%, Sensitivität 60%) herangezogen werden (105).

In diesem Zusammenhang wurde bei neun Patienten ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) festgestellt. Bei den Patienten mit nachgewiesener Leberzirrhose wurde in der Regel ein sonographisches Screening auf Leber Raumforderungen durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte die hausärztliche Überweisung oder Übernahme aus peripheren Krankenhäusern bei suspekter Leber Raumforderung zur weiteren Abklärung. In einzelnen Fällen lag bereits ein bekanntes oder auswärtig gesichertes, manifestes HCC vor.

Die Diagnose eines HCC bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose wurde nach den „European Association for the study of the liver“ (EASL) – Kriterien getroffen. Bei Läsionen von 1-2 cm Größe durch übereinstimmende Sicherung von zwei unabhängigen bildgebenden Verfahren. Bei Läsionen >2 cm durch ein bildgebendes Verfahren mit arteriell hypervaskularisierter Läsion und einem AFP von >400 ng/ml. An bildgebenden Verfahren wurden Kontrastmittelsonographie, CT-Abdomen, MRT oder Angiographie angewandt. Damit konnte in der Mehrzahl der Fälle eine eindeutige Unterscheidung zwischen benignem oder malignem Befund getroffen werden. Bei unklarer Dignität wurde eine perkutane Leberbiopsie, in der Regel CT-gesteuert, alternativ Sonographie-gesteuert, durchgeführt.

3.2.4. Einteilung des Patientenkollektivs in Patienten mit und ohne Peritonitis

Bei den Ursachen des infizierten Aszites ist vor allem zu unterscheiden zwischen einer spontan-bakteriellen Peritonitis (SBP) und einer sekundären bakteriellen Peritonitis. Eine sekundäre Peritonitis kann beispielsweise gekennzeichnet sein durch freie abdominelle Luft in der Bildgebung bzw. dem Nachweis eines multi-mikrobiellen Aszites. An Laborparametern weisen ein Glucosegehalt <50 mg/dl, LDH > 225 U/l, Gesamtprotein > 10 g/l oder eine Granulozytenzahl > 5000/ml im Aszites auf eine sekundäre Peritonitis hin (106).

Während die Häufigkeit der SBP mit etwa 10-20% aller Fälle eines portalen Aszites anzunehmen ist, ist die sekundäre Peritonitis etwa zehnmal seltener. Da letztere häufig durch eine intestinale Perforation verursacht ist, weist sie fast immer mehrere Erreger und meist auch Anaerobier auf, während bei der SBP überwiegend nur ein Erreger nachzuweisen ist. In etwa 80% der Fälle handelt es sich bei der SBP um gramnegative Keime (107). Häufigster Erreger ist *Escherichia coli*, gefolgt von *Klebsiella-Spezies* und anderen gram-negativen Keimen der intestinalen Flora (z.B. *Enterococcus faecialis*). Grampositive Bakterien, am häufigsten *Streptokokken-Spezies*, werden in 20% aller Fälle gefunden (107). Anaerobier treten in nicht mehr als 5% der Fälle auf (107).

Im Rahmen der frühzeitigen Detektierung einer SBP wurde bei den Patienten auf einen Kreatininanstieg und/oder Rückgang der Diurese, abdominelle Schmerzen, Peritonismus und Entwicklung von Fieber geachtet. Gleiches galt für weitere Zeichen einer möglichen Entstehung einer SBP, wie dem Auftreten oder der Verschlechterung einer hepatischen Enzephalopathie, eine Hypotonie oder ein Nierenversagen (108). Da

jedoch grundsätzlich jede Verschlechterung des Zustandes eines Patienten mit Leberzirrhose und Aszites, aber auch ein therapierefraktärer Aszites ohne ausgeprägte Zeichen einer Infektion, an das Vorliegen einer SBP denken lässt (108), wurde in diesen Fällen eine frühzeitige Diagnostik in Form von Aszitespunktion und mikrobiologische Evaluation angestrebt.

Eine SBP ist definiert durch einen neutrophilen Granulozytenanteil – „polymorphonuclear leukocyte count“ (PMN) im Aszites von >250 Zellen/ μl . Bei gleichzeitigem kulturellen Nachweis spricht man von einer Kultur-positiven SBP. Ein „Bakteraszites“ ist dagegen definiert durch einen PMN <250 Zellen/ μl bei kulturellem bakteriellen Nachweis (109). Es wurden BacT/Alert Kultursysteme verwendet. Um eine mögliche Verbindung zwischen Adipokinen im Aszites und Bestehen einer Peritonitis, unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache (SBP/sekundäre Peritonitis) zu eruieren, wurde eine Peritonitis jedweder Genese durch mikrobiologischen bakteriellen Kulturnachweis und/oder einem neutrophilen Granulozytenwert $>250/\mu\text{l}$ und/oder einem Leukozytenwert von $>500/\mu\text{l}$ definiert.

3.3. Aufklärung der Patienten

Jeder Patient wurde über Inhalt und Risiken der Studie ausführlich aufgeklärt und das schriftliche Einverständnis der Patienten eingeholt. Sofern die Einwilligungsfähigkeit von Patienten, aufgrund der Schwere der Erkrankung, nicht möglich war, wurde die Studienteilnahme, mit Angehörigen oder den gesetzlichen Betreuern besprochen. Die Aufklärung umfasste eine Datenschutzerklärung, in der jeder Patient schriftlich einwilligte, dass personenbezogene Daten, insbesondere Daten über den Gesundheitszustand des Patienten, über einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren aufbewahrt werden dürfen. Weiter wurde die Teilnahme an der Studie schriftlich bestätigt. Eine gesonderte Einverständniserklärung wurde zudem für Venenpunktionen zur Blutprobengewinnung von jedem Patienten eingeholt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

3.4. Asservierung der Proben

Die Aszitesproben wurden sowohl im Rahmen von diagnostischen, als auch therapeutischen Punktionen gewonnen. Nach Einholung des Einverständnisses des Patienten und schriftlicher Dokumentation erfolgte die sonographische Untersuchung des Aszitesausmaßes, sowie Markierung einer günstigen Punktionsregion ohne Nähe zu verletzbaren Organen oder Gefäßen (A. epigastrica inferior am lateralen Rand des M. rectus abdominis, portale Umgehungskreisläufe und wiedereröffnete fetale Gefäße). Am häufigsten wurde im Bereich des Monroepunkt (im dritten äußeren Viertel einer Linie zwischen Nabel und Spina iliaca anterior superior), bevorzugt an der linken Seite, punktiert.

Zur Parazentese wurde eine Direktpunktion favorisiert. Zum Ablassen der meist serösen Flüssigkeit wurde eine für diese Zwecke entwickelte 6-French „Schlottmann-Nadel“ mit steifer Führung, Seitenlöchern und einer der äußeren Bauchdecke zugewandten praktischen Fixierungsplatte verwendet (siehe Abbildung 8). Diese bietet im Vergleich zu herkömmlichen Punktionen mit einer Venenverweilkanüle bezüglich der Notwendigkeit und der Zahl der Lageänderungen der Nadel während der Punktion, der Notwendigkeit der Repunktion, der subjektiven Praktikabilität der Parazentese und der Patientenakzeptanz eine signifikante Überlegenheit (110), wenngleich die Kosten höher sind.

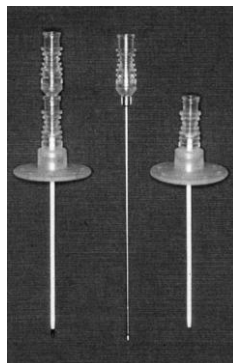


Abb. 8: Schlottmann –Nadel

Der Aszites wurde in Serum Monovetten grau-weiß 5,5 ml überführt und im Anschluss daran zehn Minuten bei 4000 „rounds per minute“ (rpm) zentrifugiert (Zentrifuge Typ Biofuge primo R, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland) und der Überstand in zehn Eppendorfcups zu je 1,5 ml aliquotiert. Gleiches Prozedere wurde im Rahmen der Serumgewinnung durchgeführt. Beide Probenarten wurden im Anschluss daran umgehend bei -20 °C eingefroren.

3.5. Adipokinbestimmung

Die Adipokine Visfatin, Resistin, Leptin und Adiponektin wurden im Aszites (n=96) und im Serum (n=79) durch ELISA-basierte Messung quantifiziert. Bei allen ELISA-Messungen wurde ein Double-Antibody Sandwich ELISA durchgeführt.

Die folgenden ELISA basierten Detektionssysteme wurden angewendet.

Visfatin: Human visfatin ELISA kit (AdipoGen, Seoul, Korea)

Resistin: Human resistin DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Leptin: Human leptin DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Adiponectin: Human adiponectin DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

3.5.1. ELISA-basierte Messung von Visfatin

Im Rahmen der ELISA-basierten Messung des Visfatin wird exemplarisch das Testprinzip eines Double – Antibody Sandwich ELISA vorgestellt. Weiter werden die benötigten Materialien und Probenvorbereitungen, sowie die Durchführung des ELISA und dessen Auswertung dargestellt.

3.5.1.1. Testprinzip eines Double – Antibody Sandwich ELISA

Der erste Antikörper, ein monoklonaler Antikörper spezifisch für humanes Visfatin, wird auf eine feste Phase, eine sogenannte 96-Well Mikroplatte, gebunden und als Coating-Antikörper bezeichnet. Die Probe, entweder Serum oder Aszites, mit dem nachzuweisenden Antigen (Visfatin) wird in die *Wells* pipettiert und anschließend inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Anti-Visfatin Coating-Antikörper das in der Probe vorhandene Visfatin. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zugegeben, ein Anti-Human polyklonaler Visfatin-Antikörper. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase-konjugierter (HRP von engl. horseradish) Anti-Kaninchen IgG-Antikörper bindet nun den zweiten Antikörper. Durch Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats entsteht eine Farbreaktion, dessen Farbintensität die Menge an

gebundenen Visfatin anzeigt. Die Farbentwicklung wird mit einer Stopplösung angehalten. Nach den einzelnen Inkubationsphasen wird die Platte gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen.

3.5.1.2. Benötigte Materialien und Probenvorbereitungen

Der Hersteller stellte eine eigene Antikörper (monoklonaler Antikörper gegen humanes Visfatin) - gecoatete 96-Wellplatte mit 12x8 Well Streifen bereit. Weiter standen eine Waschlösung, eine Verdünnungslösung, der sekundäre Antikörper, sowie der Detektionsantikörper (mit Meerrettichperoxidase-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper) zur Verfügung. Gleiches galt für den Standard (32 ng rekombinantes humanes Visfatin), der Positivkontrolle (aus rekombinantem gefriergetrocknetem humanen Visfatin), der Substratlösung (chromogenes Reagenz) und der Stopplösung (1 M H_3PO_4). Die Materialien wurden bei 2-8 °C aufbewahrt und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Das Waschlösungskonzentrat verdünnte man 1:10 mit destilliertem Wasser, gleiches galt für das Verdünnungsmittel. Der Detektionsantikörper wurde 1:100 verdünnt und innerhalb einer Stunde verwendet. Die Standards erstellte man folgendermaßen. Der Standard (32ng) wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und gründlich vermischt. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,0625 ng/ml erstellt.

3.5.1.3. Durchführung des Assay

Je 100µl der neun verschiedenen Standards, eine Negativkontrolle (Verdünnungslösung), eine Positivkontrolle (siehe 3.5.1.2) und die unverdünnte Probenlösung von Serum oder Aszites wurden in die einzelnen Wells pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für drei Stunden. Die Lösung wurde vollständig entfernt und drei Mal mit 350 µl pro Well Waschlösung gespült. Vom zweiten Antikörper wurden in jedes Well 100 µl zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen inkubierte man für eine Stunde mit je 100 µl Detektionsantikörper. Nach dem letzten Waschschrift (fünfmalige Wiederholung) folgte die Substratlösung mit 100µl pro Well und die 96-Well Platte wurde daraufhin zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte schützte man dabei vor Lichteinfall. Im Anschluss daran wurden 100 µl Stopplösung zugesetzt. Die optische Dichte eines jeden

einzelnen Well wurde umgehend mittels Elisa Reader (Biotech ELX 808, Software KC junior) bei 450 nm gemessen.

3.5.1.4. Auswertung der ELISA-basierten Messung von Visfatin

Die Auswertung des Tests erfolgte nach Herstellerempfehlung mittels der 4-Parameter-Funktion. Aus den Messreihen der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt.

3.5.2. ELISA-basierte Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin

Im Folgenden sollen die bereitgestellten Materialien und Lösungen, sowie die Durchführung und die Auswertung der ELISA-basierten Messung für Resistin, Leptin und Adiponektin zusammenfassend dargestellt werden.

3.5.2.1. Bereitgestellte Materialien und Lösungen für die ELISA-basierte Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin

Es folgt die Beschreibung des Coating-Antikörpers, des Detektionsantikörpers, der Standards und der Streptavidin-HRP (Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase, engl. horseradish) für Resistin, Leptin und Adiponektin.

Bereitgestellte Materialien für die ELISA-basierte Messung von Resistin

Coating-Antikörper - 720 µl/ml von Maus Anti-Human Resistin wurde in 1,0 ml PBS (Phosphat-gepufferte Saline) aufgelöst. Im Anschluss daran lagerte man diesen bei 2-8°C für maximal 60 Tage. Der ELISA wurde mit einer Konzentration von 4,0 µg/ml in PBS ohne Carrier-Protein durchgeführt.

Detektionsantikörper - 45 µg/ml von biotinierten Maus Anti-Human Resistin wurde in 1,0 ml der Reagenzlösung aufgelöst. Dieser Antikörper konnte ebenfalls bei 2-8°C für maximal 60 Tage gelagert werden. Zur Anwendung im ELISA wurde der Antikörper in einer Konzentration von 0,25 µg/ml in Reagenzlösung aufgelöst.

Standards – 30 ng/ml von rekombinanten Human-Resistin wurde in 0,5 ml Reagenzlösung aufgelöst. Vor der Verdünnung inkubierte man den Standard für 20 Minuten bei leichtem Schütteln. Die Lösungen wurden aliquotiert und für maximal zwei Monate bei -70°C gelagert. Eine Standardkurve mit 2,5-facher Verdünnung in der

Reagenzlösung und ein hoher Standard von 2000 pg/ml wurden erstellt. Aufgrund der breiten Varianz der Messwerte wurde statt der empfohlenen zweifachen eine 2,5-fache Verdünnung durchgeführt. Es wurden die Standards mit den Werten 2000 pg/ml, 800 pg/ml, 320 pg/ml, 128 pg/ml, 51,2 pg/ml, 20,5 pg/ml, 8,2 pg/ml errechnet.

Straptavidin-HRP - 1,0 ml von Straptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase wurde verwendet und für maximal sechs Monate bei 2-8 °C nach der ersten Anwendung aufbewahrt. Es handelte sich um eine 1:200 Verdünnung in Reagenzlösung.

Bereitgestellte Materialien für die ELISA-basierte Messung von Leptin

Coating-Antikörper - 720 µl/ml von Maus Anti-Human Leptin wurde in 1,0 ml PBS aufgelöst. Im Anschluss daran lagerte man diesen bei 2-8°C für maximal 60 Tage. Den ELISA führte man mit einer Konzentration von 4,0 µg/ml in PBS ohne Carrier-Protein durch.

Detektionsantikörper - 2,25 µg/ml von biotinierten Maus Anti-Human Leptin wurde in 1,0 ml der Reagenzlösung aufgelöst. Dieser Antikörper konnte ebenfalls bei 2-8°C für maximal 60 Tage gelagert werden. Zur Anwendung im ELISA wurde der Antikörper in einer Konzentration von 12,5 ng/ml in Reagenzlösung aufgelöst.

Standards – 60 ng/ml von rekombinanten Human-Leptin wurde mit 0,5 ml destilliertem Wasser versetzt. Vor der Verdünnung inkubierte man den Standard für 20 Minuten bei leichtem Schütteln. Die Lösungen wurden aliquotiert und für maximal zwei Monate bei -70 °C gelagert. Eine Standardkurve mit 2,5-facher Verdünnung in der Reagenzlösung und ein hoher Standard von 2000 pg/ml wurden erstellt. Aufgrund der breiten Varianz der Messwerte wurde statt der empfohlenen 2-fachen eine 2,5-fache Verdünnung durchgeführt. Es wurden die Standards mit den Werten 2000 pg/ml, 800 pg/ml, 320 pg/ml, 128 pg/ml, 51,2 pg/ml, 20,5 pg/ml, 8,2 pg/ml errechnet.

Streptavidin-HRP - 1,0 ml von Straptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase wurde verwendet und für maximal sechs Monate bei 2-8 °C nach der ersten Anwendung aufbewahrt. Es handelte sich um eine 1:200 Verdünnung in Reagenzlösung.

Bereitgestellte Materialien für die ELISA-basierte Messung von Adiponektin

Coating-Antikörper - 360 µl/ml von Maus Anti-Human Adiponektin wurde in 1,0 ml PBS aufgelöst. Im Anschluss daran lagerte man diesen bei 2-8°C für maximal 60 Tage. Der

ELISA wurde mit einer Konzentration von 2,0 µg/ml in PBS ohne Carrier-Protein durchgeführt.

Detektionsantikörper - 360 µg/ml von biotinierten Maus Anti-Human Leptin wurde in 1,0 ml der Reagenzlösung aufgelöst. Dieser Antikörper konnte ebenfalls bei 2-8°C für maximal 60 Tage gelagert werden. Zur Anwendung im ELISA wurde der Antikörper in einer Konzentration von 2,0 µg/ml in Reagenzlösung aufgelöst.

Standards – 80 ng/ml von rekombinanten Human-Adiponektin wurde in 0,5 ml Reagenzlösung aufgelöst. Vor der Verdünnung inkubierte man den Standard für 20 Minuten bei leichtem Schütteln. Die Lösungen wurden aliquotiert und für maximal zwei Monate bei -70°C gelagert. Eine Standardkurve mit 2,5-facher Verdünnung in der Reagenzlösung und ein hoher Standard von 4000 pg/ml wurden erstellt. Aufgrund der breiten Varianz der Messwerte wurde statt der empfohlenen zweifachen eine 2,5-fache Verdünnung durchgeführt. Es wurden die Standards mit den Werten 4000 pg/ml, 1600 pg/ml, 640 pg/ml, 256 pg/ml, 102,4 pg/ml, 41 pg/ml, 16,4 pg/ml errechnet.

Straptavidin-HRP - 1,0 ml von Straptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase wurde verwendet und für maximal sechs Monate bei 2-8°C nach der ersten Anwendung aufbewahrt. Es handelte sich um eine 1:200 Verdünnung in Reagenzlösung.

Bereitgestellte Lösungen für die ELISA-basierte Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin

Tab. 5: Zusammenfassung der bereitgestellten Lösungen und Reagenzien

<i>Substratlösung</i>	1:1 Mischung von Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)
<i>Stopplösung</i>	2 N H ₂ SO ₄ (Sigma Life Science, Taufkirchen, Deutschland)
<i>PBS</i>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2 – 7,4 (PBS Dulbecco Biochrom AG, Rhein, Deutschland)
<i>Waschpuffer</i>	0,05 % Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,2 – 7,4 in PBS
<i>Reagenzlösung</i>	1% BSA (Sigma Life Science, Taufkirchen, Deutschland) in PBS

3.5.2.2. Durchführung der ELISA-basierten Messung von Resistin, Leptin und Adiponktin

Zunächst wurde die Platte präpariert, im Anschluss daran der Assay durchgeführt

Plattenpräparation

Der Coating-Antikörper wurde mit einer Konzentration 4,0 µg/ml in PBS ohne Carrierprotein verdünnt. Die 96-Well Lochplatte (EIA RIA 96 Plate Corning, New York, USA) beschichtete man im Anschluss daran mit 100 µl pro Well vom verdünnten Coating-Antikörper. Die Platte wurde geschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Während der Waschprozedur füllte man jedes Well mit 400 µl Waschpuffer. Die Flüssigkeit wurde dabei nach jedem Schritt möglichst vollständig verworfen. Nach dem letzten Waschschritt entfernte man den übrig gebliebene Waschpuffer durch Abdrücken gegen ein sauberes Papiertaschentuch. Die Platten wurden durch Zugabe von je 300 µl Reagenzlösung blockiert und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Der Waschschritt wurde wiederholt, im Anschluss daran war die Platte bereit für die Probenzugabe.

Schematische Darstellung der Assay Durchführung

1. Es wurden jeweils 100 µl Probe (Serum oder Aszites), die zuvor mit 1:20 (Resistin und Leptin) bzw. 1:6000 (Adiponektin) verdünnt wurde und die verschiedenen Standards in die einzelnen Wells pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm überdeckt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen (Waschschritt siehe Plattenpräparation)
2. Es folgte je 100 µl des mit Reagenzlösung versetzten Detektionsantikörper (0,25 µg/mL). Die Platte wurde mit neuem Parafilm überdeckt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen.
3. Je 100 µl 1:200 verdünnte Streptavidin-Meerrettichperoxidase wurde zugegeben. Die Platte wurde mit Parafilm überdeckt und bei 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Man vermied, die Platte in direktes Licht zu stellen.

4. Es erfolgte die Zugabe von je 100 µl Substratlösung und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur
5. Je 50 µl Stopplösung wurden pro Well pipettiert. Die Platte wurde im Anschluss daran vorsichtig geschüttelt.
6. Die optische Dichte wurde umgehend festgelegt, indem der Elisa-Reader (Biotech ELX 808, Software KC junior, Bad Friedrichshall, Deutschland) auf 450nm eingestellt wurde. Es wurden keine Wellenlängenkorrekturen vorgenommen.

3.5.2.3. Auswertung der ELISA-basierten Messung von Resistin, Leptin und Adiponektin

Die Auswertung des Tests erfolgte nach Herstellerempfehlung mittels der 4-Parameter-Funktion. Aus den Messreihen der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt. Um die tatsächliche Menge an Resistin, Leptin und Adiponektin zu ermitteln, wurde der aus der Eichkurve ermittelte Wert mit dem Verdünnungsfaktor von 20 (Resistin und Leptin) beziehungsweise 6000 (Adiponektin) multipliziert.

4. Ergebnisse

Im Folgenden soll eine Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse der ELISA-basierten Detektion der verschiedenen Adipokine und nachfolgender Subgruppenanalysen dargestellt werden.

4.1. Statistik

Für Parameter, die nicht normal verteilt waren, wurde der Mann & Whitney-U-Test für den Vergleich von Mittelwerten \pm SEM („standard error oft the mean“) herangezogen. Bei Werten, die einer Gaußschen Verteilung folgten, wurde der Student's t-test angewandt. Statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ definiert. Für den Vergleich von klassifizierten Parametern wurde der χ^2 Test benutzt. Der bivariate Korrelationsanalysentest (Pearson's test) diente für Korrelationsanalysen. Korrelationen zwischen verschiedenen Werten wurden mittels Regressionsanalysen mit Berechnung von r & r^2 durchgeführt.

4.2. Charakterisierung der Studienkohorte

Tab. 6: Charakterisierung der Studienkohorte

Studienkohorte	Häufigkeit numerisch und in %
Gesamtzahl	96 (100 %)
Männer n (%)	71 (74.0 %)
Frauen n (%)	25 (26.0 %)
BMI kg/m ² (Mittelwert \pm SEM)	26.1 \pm 0.8 (range: 15.4 – 66.9)
Alter in Jahre (Mittelwert \pm SEM)	58 \pm 1 (range: 32 – 85)
Leberzirrhose	76 (79.2 %)
Keine Leberzirrhose	20 (20.8 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh A	6 (7.9 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh B	29 (38.2 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh C	41 (53.9 %)
<i>Ursache der Leberzirrhose:</i>	
Alkohol	53 (69,7 %)
Chronische Hepatitis B/C	12 (15,8 %)
Andere	11 (14,5 %)
Keine Zirrhose	20 (20.8 %)
<i>Ursache des Aszites:</i>	
Portale Hypertension	76 (79.2 %)
Maligne	9 (9.4 %)
Kardial	5 (5.2 %)
Pankreatogen	3 (3.1 %)
Andere	3 (3.1 %)
Hepatozelluläres Karzinom	9 (9.4 %)
Kein Hepatozelluläres Karzinom	87 (90.6 %)
Peritonitis	17 (17.7 %)
Keine Peritonitis	79 (82.3 %)

4.2.1. Bestimmung der Basisparameter

Es nahmen 71 Männer und 25 Frauen an der Studie teil. Das mittlere Alter betrug 58 ± 1 Jahre (Spannweite 32 - 85 Jahre) und der mittlere BMI $26,1 \pm 0,8$ (Spannweite 15,4 - 66,9 kg/m²).

4.2.2. Vorhandensein und Abwesenheit einer Leberzirrhose und Child-Pugh Score

Es wurde bei 76 (79,2%) Patienten eine Leberzirrhose detektiert, 20 (20,8%) Patienten wiesen keine Leberzirrhose auf. Epidemiologische Daten zeigen, dass 50% der Patienten mit Leberzirrhose nach erstmaliger Entwicklung eines Aszites binnen zwei Jahren versterben (105). Dementsprechend wies das Patientenkollektiv der Studie insgesamt auch hohe Child-Pugh-Score Werte auf. Bei 41 (53,9%) Patienten errechnete sich ein Child-Pugh Score C, bei 29 (38,2%) Patienten ein Child-Pugh Score B und lediglich bei 6 (7,9%) Patienten ein Child-Pugh Score A.

4.2.3. Ätiologie der Leberzirrhose

Bei der ätiologischen Klärung der Leberzirrhose konnte festgestellt werden, dass Alkoholabusus mit 53 Patienten (69,7% der Patienten mit Leberzirrhose) die deutlich führende Zirrhosegenese darstellte und damit über dem in der Literatur angegebenen Wert für Häufigkeiten in Industrieländern von etwa 50% lag (111). Zwölf Patienten (15,8%) wiesen als Genese eine Hepatitis B (zwei Patienten) oder Hepatitis C (zehn Patienten) auf. Bei elf (14,5%) Patienten waren andere Ursachen einer Leberzirrhose vorhanden (vier Patienten mit kryptogener Ursache, zwei Patienten mit NASH mit zirrhotischem Umbau, ein Patient mit Overlap-Syndrom bestehend aus Autoimmunhepatitis und primär biliärer Zirrhose (PBC), ein Patient mit Hämatochromatose, ein Patient mit Morbus Wilson, ein Patient mit einer Zirrhose cardiaque bei dekompensierter Rechtsherzinsuffizienz mit hochgradiger Trikuspidalklappeninsuffizienz und mittelgradiger Mitralklappeninsuffizienz und ein Patient mit PSC).

4.2.4. Ätiologie des Aszites

Bei 76 Patienten (79,2%) konnte als Ursache des Aszites eine portale Hypertension verifiziert werden. Hiervon wiesen 75 Patienten eine Leberzirrhose, ein Patient eine Pfortaderthrombose auf. Bei neun Patienten (9,4%) konnte eine Malignität als mögliche Ursache des Aszites festgestellt werden. Dabei handelte es sich in drei Fällen um ein unifokales HCC, in sechs Fällen um ein multifokales HCC. Bei fünf (5,2%) Patienten konnte eine kardiale Ursache angenommen werden, wobei ein Patient gleichzeitig eine Zirrhose cardiaque entwickelte. Bei der Einteilung dieses Patienten in die Gruppe kardiale versus portale Genese des Aszites konnte man den Gesamteiweißgehalt von

28,4 g/l im Aszites mit in Betracht ziehen. Bei Werten >25 g/l gilt eine kardiale Genese als sehr wahrscheinlich, eine portale als eher unwahrscheinlich (105). Bei drei (3,1%) Patienten lag eine pankreatogene Ursache vor (in zwei Fällen eine akute nekrotisierende Pankreatitis alkoholischer Genese, in einem Fall eine biliäre akute Pankreatitis). Ebenfalls bei drei Patienten (3,1%) wurde eine andere Ätiologie (in zwei Fällen eine sekundär bakterielle Peritonitis mit Darmperforation und kotigem Aszites, in einem Fall eine generalisierte Enterokokkensepsis mit akutem Nierenversagen) gefolgert.

4.2.5. Vorhandensein oder Abwesenheit einer Peritonitis

Bei 79 Patienten (82,3%) wurde keine Peritonitis festgestellt. 17 Patienten (17,7%) konnten in die Peritonitisgruppe (zwei Patienten mit sekundärer Peritonitis, drei Patienten mit Bakteraszites und 13 Patienten mit SBP) eingeteilt werden.

4.3. Bestimmung der Adipokinkonzentrationen

Mit Hilfe der oben beschriebenen ELISA-Untersuchungen konnten die Adipokine Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin in peritonealer Flüssigkeit nachgewiesen und quantifiziert werden. Tabelle 7a und 7b fassen die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. Weiter wurden die Konzentrationen der verschiedenen Adipokine im Serum per ELISA-Messung bestimmt.

Tabelle 7a: Subgruppenanalyse von Adiponektin und Leptin

Subgruppen	Adiponektin (g/ml)	Leptin (ng/ml)
	<i>Peritoneale Flüssigkeit</i>	<i>Peritoneale Flüssigkeit</i>
Gesamtzahl (n=96)	1.7 ± 0.2 (Spanne: 0.3 - 9.9)	14.9 ± 2.1 (Spanne: 1.4 – 137.4)
Männer	1.6 ± 0.2	15.0 ± 2.7
Frauen	1.7 ± 0.2	14.4 ± 2.6
BMI < 25 kg/m ² (n=37)	1.6 ± 0.3	9.9 ± 1.9
BMI ≥ 25 kg/m ² (n=59)	1.7 ± 0.2	18.0 ± 3.1
Leberzirrhose	1.6 ± 0.2	15.9 ± 2.5
Keine Leberzirrhose	1.8 ± 0.2	11.0 ± 2.7
Leberzirrhose CHILD-Pugh B	1.3 ± 0.2	16.4 ± 5.0
Leberzirrhose CHILD-Pugh C	1.8 ± 0.3	15.8 ± 2.7
Hepatozelluläres Karzinom	1.7 ± 0.4	21.6 ± 8.3
Kein Hepatozelluläres Karzinom	1.7 ± 0.2	14.2 ± 2.1
Peritonitis	1.7 ± 0.3	9.5 ± 2.0
Keine Peritonitis	1.7 ± 0.2	16.1 ± 2.5

Tabelle 7b: Subgruppenanalyse von Resistin und Visfatin

Subgruppen	Resistin (ng/ml)	Visfatin (ng/ml)
	<i>Peritoneale Flüssigkeit</i>	<i>Peritoneale Flüssigkeit</i>
Gesamtzahl (n=96)	17.6 ± 3.4 (Spanne: 0.6 – 196.9)	3.5 ± 1.0 (Spanne: 0.12 – 82.8)
Männer	17.8 ± 4.0	2.7 ± 0.4
Frauen	16.8 ± 6.7	6.0 ± 3.8
BMI < 25 kg/m ² (n=37)	20.0 ± 6.6	4.2 ± 2.4
BMI ≥ 25 kg/m ² (n=59)	16.1 ± 3.8	3.1 ± 0.5
Leberzirrhose	17.5 ± 4.2	3.5 ± 1.2
Keine Leberzirrhose	17.2 ± 4.3	3.8 ± 0.2
Leberzirrhose CHILD-Pugh B	22.3 ± 8.1	5.7 ± 3.0
Leberzirrhose CHILD-Pugh C	14.8 ± 4.6	2.1 ± 0.3
Hepatozelluläres Karzinom	11.0 ± 3.2	1.5 ± 0.3
Kein Hepatozelluläres Karzinom	18.2 ± 3.8	3.7 ± 1.1
Peritonitis	39.7 ± 14.9 *	8.9 ± 6.2
Keine Peritonitis	13.1 ± 2.6	2.6 ± 0.4

4.3.1. Detektion von Adiponektin in peritonealer Flüssigkeit

Adiponektin war in allen Aszitesproben detektierbar (Tabelle 7a). Im Allgemeinen waren die Adiponektinkonzentrationen im Aszites niedrig (Mittelwert $1,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$, Spanne 0,3 - 9,9 $\mu\text{g/ml}$) und die mittleren Konzentrationen in fast allen Subgruppen identisch. Regressionsanalysen zeigten, dass eine signifikante, positive Korrelation zwischen Adiponektinkonzentrationen im Aszites und Serum besteht (Abbildung 9) ($p < 0,001$, $r = 0,57$).

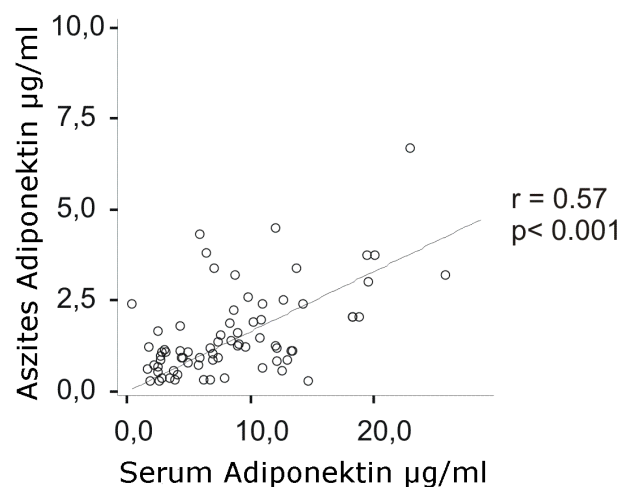


Abb. 9: Korrelationskurve der Adiponektinkonzentrationen im Serum und Aszites

4.3.2. Detektion von Leptin in peritonealer Flüssigkeit

Leptin konnte in allen Aszitesproben mit einer großen Spannweite detektiert werden (Mittelwert $14,9 \pm 2,1$ ng/ml, Spanne $1,4 \pm 137,4$ ng/ml) (Tabelle 7a). Es konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen Leptinkonzentrationen im Aszites und dem BMI festgestellt werden ($p = 0,009$). Wie bereits in der Literatur bekannt, fanden sich die Leptinkonzentrationen im Serum positiv mit dem BMI korreliert ($p < 0,001$).

In der Gruppe BMI ≥ 25 kg/m² tendierten die Leptinkonzentrationen im Aszites zu deutlich höheren Werten ($18,0 \pm 3,1$ ng/ml), als in der Gruppe mit BMI < 25 kg/m² ($9,9 \pm 1,9$ ng/ml). Jedoch erreichte dieser Trend keine statistische Signifikanz ($p = 0,07$). Dagegen waren die Leptinkonzentrationen im Serum in der Gruppe BMI ≥ 25 kg/m² ($22,9 \pm 6,1$ ng/ml) im Vergleich zur Gruppe BMI < 25 kg/m² ($4,2 \pm 0,9$ ng/ml) signifikant erhöht ($p = 0,003$).

Da seit geraumer Zeit bekannt ist, dass Leptinkonzentrationen im Serum positiv mit dem BMI korrelieren, wurde untersucht, ob Leptinkonzentrationen im Aszites mit den Leptinkonzentrationen im Serum möglicherweise direkt korrelieren könnten. Regressionsanalysen zeigten, dass eine signifikante positive Korrelation zwischen den Leptinkonzentrationen im Aszites und im Serum bestehen ($p < 0,001$, $r = 0,53$) (Abbildung 10).

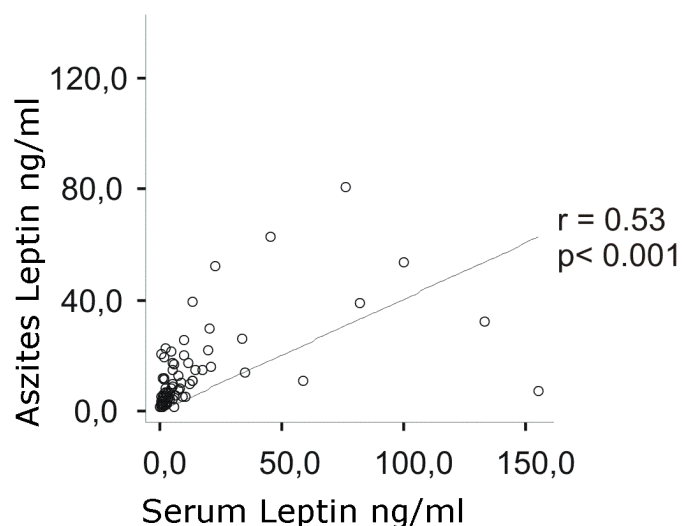


Abb. 10: Korrelationskurve der Leptinkonzentrationen im Serum und Aszites

Weiter ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen Leptinkonzentrationen im Aszites und dem Vorhandensein und der Genese einer Leberzirrhose feststellen. Während sich die Leptinkonzentrationen bei Patienten ohne Leberzirrhose ($12,6 \pm 2,0$ ng/ml) von denen mit alkoholischer Leberzirrhose ($14,3 \pm 2,2$ ng/ml) kaum unterschieden, waren die Leptinkonzentrationen bei Zirrhosepatienten mit Hepatitis B oder C am niedrigsten ($8,1 \pm 4,6$ ng/ml) und die Leptinkonzentrationen von Patienten mit kryptogener Leberzirrhose am höchsten ($32,7 \pm 12,4$ ng/ml). Der Unterschied zwischen Patienten mit kryptogener Leberzirrhose und Patienten ohne Leberzirrhose war statistisch signifikant ($p = 0,01$). Gleiches galt für die Leptinkonzentrationen zwischen der Gruppe Hepatitis B/C ($8,1 \pm 4,6$ ng/ml) und der Gruppe mit kryptogener Leberzirrhose ($32,7 \pm 12,4$ ng/ml) ($p = 0,004$).

4.3.3. Detektion von Resistin in peritonealer Flüssigkeit

Resistin war in allen Aszitesproben mit einer großen Spannweite detektierbar (Mittelwert $17,6 \pm 3,4$ ng/ml, Spanne 0,6 - 196,9 ng/ml) (Tabelle 7b). Subgruppenanalysen zeigten bei Patienten mit Peritonitis signifikant ($p = 0,003$) höhere Resistinkonzentrationen im Aszites ($39,7 \pm 14,9$ ng/ml) im Vergleich zu Patienten ohne Peritonitis ($13,1 \pm 2,6$ ng/ml). Wie Abbildung 11 zeigt, waren die Resistinkonzentrationen im Aszites signifikant und positiv mit dem peripheren weißen Blutbild (Leukozytenzahl) korreliert ($p = 0,001$) ($r = 0,35$).

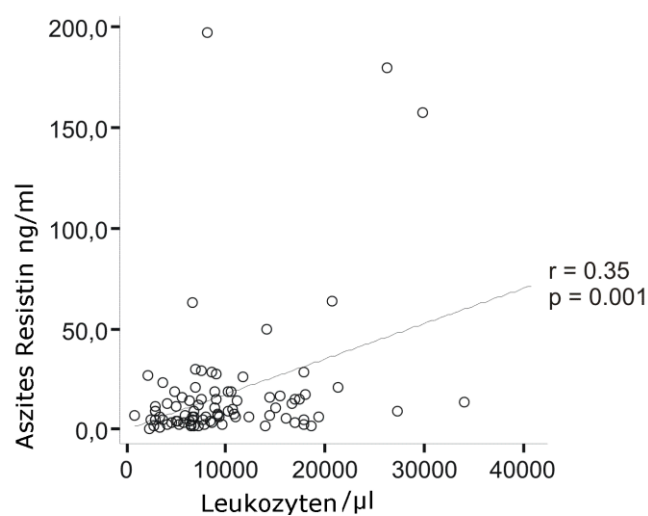


Abb. 11: Korrelationskurve zwischen Leukozytenzahlen im Serum und Resistinkonzentrationen im Aszites

Dagegen konnte keine Korrelation der Resistinkonzentrationen im Aszites mit der Leukozytenzahl im Aszites gefunden werden. Im Unterschied zu Adiponektin, Leptin und Visfatin war ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen Aszites- und Serumkonzentrationen festzustellen ($r = 0,1$; $p = 0,3$) (siehe Abbildung 12).

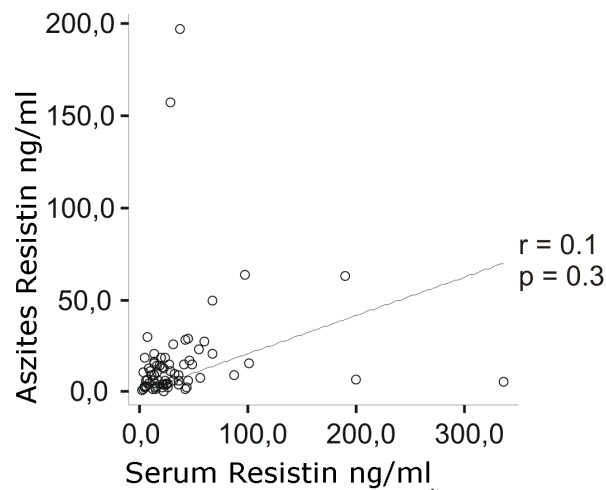


Abb. 12: Korrelationskurve der Resistinkonzentrationen im Serum und Aszites

Eine signifikante und positive Korrelation zwischen Resistinkonzentrationen im Aszites und Visfatinkonzentrationen im Aszites wurde durch Regressionsanalysen nachgewiesen ($p < 0,001$, $r = 0,64$) (siehe Abbildung 13).

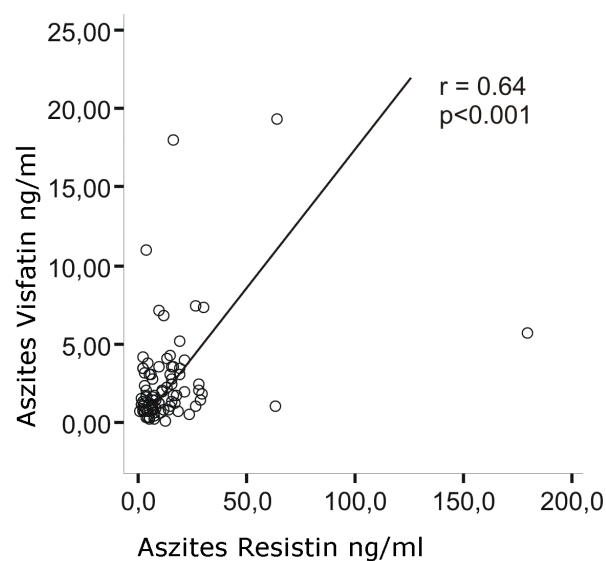


Abb. 13: Korrelationskurve zwischen Resistin- und Visfatinkonzentrationen im Aszites

In ähnlicher Weise wurde eine signifikante und positive Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von Resistin und Visfatin gefunden ($p = 0,012$, $r = 0,3$) (siehe Abbildung 14).

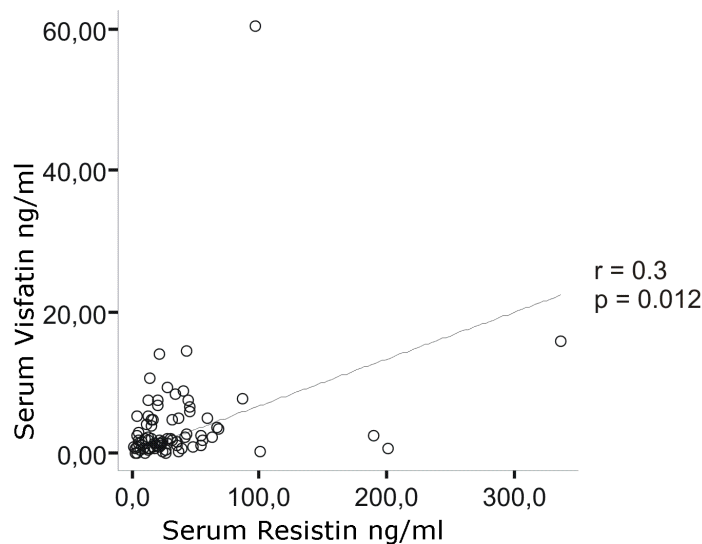


Abb. 14: Korrelationskurve zwischen den Serumkonzentrationen von Resistin und Visfatin

4.3.4. Detektion von Visfatin in peritonealer Flüssigkeit

Visfatin wurde in allen Aszitesproben mit einer großen Spannweite detektiert (Mittelwert $3,5 \pm 1,0$ ng/ml, Spanne 0,12 - 82,8 ng/ml) (Tabelle 7b). Es wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen Visfatinkonzentrationen im Aszites mit dem C-reaktiven Protein (CRP)-Wert im Serum ($p = 0,001$) und dem peripheren weißen Blutbild ($p < 0,001$) festgestellt. Weiter war eine signifikante positive Korrelation zwischen den Visfatinkonzentrationen im Serum und dem peripheren weißen Blutbild vorhanden ($p = 0,002$). Regressionsanalysen zeigten eine signifikante und positive Korrelation zwischen Visfatinkonzentrationen im Aszites und Serum ($p = 0,027$) (Abbildung 15).

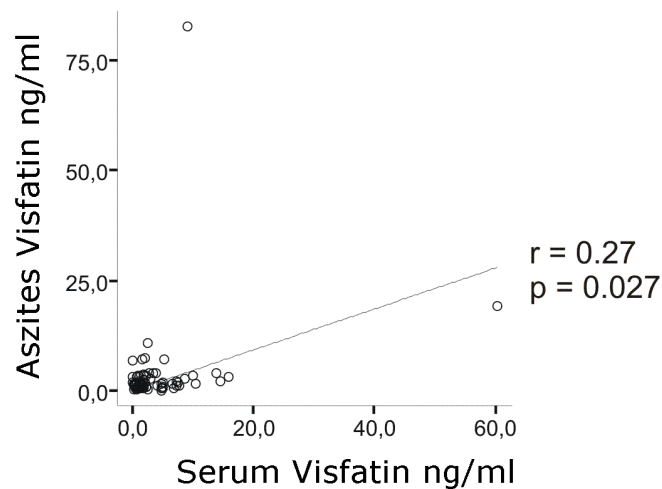


Abb. 15: Korrelationskurve der Visfatinkonzentrationen im Aszites und Serum

Visfatinkonzentrationen im Serum waren signifikant ($p = 0,001$) niedriger bei Patienten mit Leberzirrhose ($2,7 \pm 0,4$ ng/ml) im Vergleich mit Patienten ohne Leberzirrhose ($10,1 \pm 4,1$ ng/ml). Bei der Untersuchung der verschiedenen Ätiologien der Leberzirrhose stellte sich heraus, dass bei Patienten, die an Alkohol-assoziiierter Leberzirrhose ($2,8 \pm 0,5$ ng/ml) und kryptogener Leberzirrhose ($2,1 \pm 0,8$ ng/ml) litten, die Visfatinkonzentrationen im Serum im Vergleich mit Patienten ohne Leberzirrhose signifikant niedriger waren ($p = 0,046$).

4.4. Berechnung der Serum/Aszites – Ratio (SAR) für Adipokine

Insbesondere die Messung der Leptinkonzentrationen im Aszites erbrachte bei einigen Studienteilnehmern höhere Werte als deren zugehörige Serumkonzentrationen. Damit kann davon ausgegangen werden, dass das omentale Fettgewebe in der Peritonealhöhle selbst Adipokine autochthon produziert. Damit würde jedoch die Berechnung eines einfachen Serum/Aszites – Gradienten (SAG) bei einigen Patienten negative Werte ergeben, da die Asziteskonzentrationen bei diesen Patienten größer wären als deren Serumkonzentrationen. Deshalb ist die Berechnung einer Serum/Aszites-Ratio (SAR), wie es bereits für Albumin beschrieben ist, für die Untersuchung der Beziehungen zwischen den einzelnen Adipokinen von größerer Praktikabilität. Um die SAR-Werte für Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin zu

berechnen, werden die einzelnen Serumkonzentrationen durch die Asziteskonzentrationen geteilt. Die einzelnen SAR-Werte sind als Boxplot in Abbildung 16 zusammengefasst.

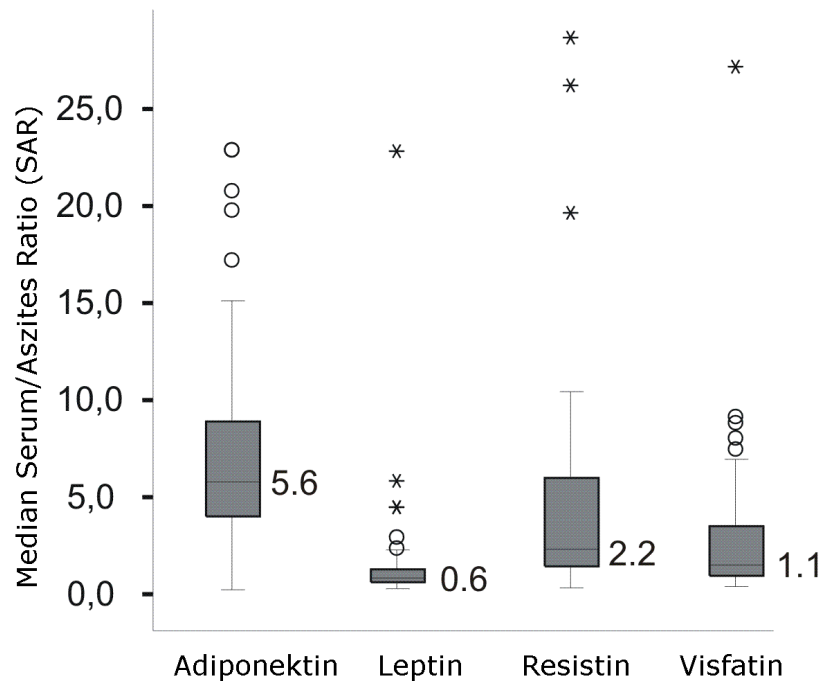


Abb. 16: Serum-Aszites Ratio (SAR) von Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin

° Abweichende Werte * Deutlich abweichende Werte

Der SAR Mittelwert \pm Standardfehler für Adiponektin lag bei $7,6 \pm 0,8$ und der Median \pm Standardabweichung bei $5,6 \pm 7,2$. Die Berechnung des SAR für Adiponektin ergab bei Patienten mit Leberzirrhose ($8,3 \pm 1,0$) signifikant ($p = 0,003$) höhere Werte, als bei Patienten ohne Leberzirrhose ($3,8 \pm 0,6$).

Der SAR Mittelwert \pm Standardfehler für Leptin lag bei $1,1 \pm 0,3$ und der Median \pm Standardabweichung bei $0,6 \pm 2,6$. Es gab keine signifikanten Korrelationen innerhalb der Subgruppenanalyse.

Der SAR Mittelwert \pm Standardfehler für Resistin lag bei $5,3 \pm 1,1$ und der Median \pm Standardabweichung bei $2,2 \pm 9,5$. Es gab keine signifikanten Korrelationen innerhalb der Subgruppenanalyse.

Der SAR Mittelwert \pm Standardfehler für Visfatin lag bei $2,3 \pm 0,4$ und der Median \pm Standardabweichung bei $1,1 \pm 3,6$. Die Berechnung des SAR für Visfatin ergab bei Patienten mit Leberzirrhose ($1,8 \pm 0,3$) signifikant ($p = 0,014$) niedrigere Werte, als bei Patienten ohne Leberzirrhose ($5,2 \pm 2,1$).

4.5. Übersicht über die Kernaussagen des Ergebnisteils

- I. Die Adipokine Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin sind in peritonealer Flüssigkeit in signifikanten Mengen nachweisbar.
- II. Außer bei Resistin gibt es bei allen Adipokinen eine positive Korrelation zwischen Serum- und Asziteskonzentrationen. Die Serum/Aszites Ratio (SAR) ist bei den einzelnen Adipokinen unterschiedlich und im Falle von Adiponektin und Visfatin abhängig von der Präsenz einer Leberzirrhose.
- III. Resistinkonzentrationen im Aszites sind bei Patienten mit Peritonitis erhöht und sowohl Resistin-, wie auch Visfatinkonzentrationen im Aszites korrelieren mit systemischen Entzündungsmarkern.
- IV. Die Leptinkonzentrationen im Serum und Aszites sind positiv mit dem BMI korreliert.
- V. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Leberzirrhose, sowie die Ursache einer Leberzirrhose beeinflussen die Adipokinkonzentrationen.

5. Diskussion

Die Adipokinexpression in peritonealer Flüssigkeit ist bisher weitgehend unbekannt. Bisher standen Untersuchungen von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit überwiegend im Fokus gynäkologischer Erkrankungen. Takemura et al. führten eine Messung von Adiponektin in peritonealer Flüssigkeit bei 54 Frauen mit Endometriose durch und stellten eine negative Korrelation mit der Schwere der klinischen Erkrankung fest (112). Die Adiponektinkonzentrationen waren bei Patientinnen mit Endometriose niedriger als in der Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich eine Stadienabhängigkeit. Patientinnen im Stadium III und IV einer Endometriose wiesen niedrigere Konzentrationen auf als Patientinnen im Stadium I und II. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, dass Adiponektin einen Endometriose-protectiven

Faktor, wahrscheinlich aufgrund seiner anti-inflammatorischen, anti-angiogenetischen und anti-fibrosierenden Eigenschaften, darstellen könnte (112). Im Gegensatz dazu waren die Leptinkonzentrationen im Aszites bei 60 Patientinnen mit Endometriose im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (113). Der Nachweis von erhöhten Leptinkonzentrationen im Aszites bei Patientinnen mit Endometriose scheint dabei auf Patientinnen mit einer peritonealer Manifestation der Endometriose beschränkt zu sein. Patientinnen mit einer ovariellen Endometriose zeigen keine erhöhten Leptinwerte im Aszites (114). Weiterhin waren die Leptinkonzentrationen im Aszites zwischen gebärfähigen und unfruchtbaren Patientinnen nicht verschieden, so dass angenommen werden kann, dass Leptin in die Pathophysiologie der Endometriose-bedingten Infertilität nicht involviert ist (115). Es kann deshalb gefolgert werden, dass Leptin einen aktiven Faktor in der Pathogenese der Endometriose darstellen könnte. Leptin besitzt angiogenetisches und mitogenetisches Potential, was wiederum die Zytokinproduktion triggert und deshalb zur Entwicklung einer Endometriose beitragen könnte. Signifikant erhöhte Konzentrationen an Leptin in der peritonealen Flüssigkeit in mehreren Studien (114-116) unterstreichen die wichtige pathophysiologische Rolle von Leptin in diesem Bereich.

Adipokine scheinen durch omentale Fettzellen produziert zu werden

Die Bedeutung von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit bei Patienten mit hepatischen Erkrankungen wurde als erstes von Giannini et al. Februar 2004 publiziert. Es wurde eine Studie mit 16 Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose mit sterilem Aszites und der Messung der Leptinkonzentrationen in peritonealer Flüssigkeit durchgeführt. Giannini et al. stellten eine Korrelation zwischen Leptinkonzentrationen im Serum und Aszites fest. Sie errechneten ein Serum/Aszites Verhältnis von 1,85. Dies würde einem in vorliegender Arbeit angewandten SAR-Wert von 0,54 entsprechen. Da alle 16 Patienten eine höhere Leptinkonzentration im Aszites aufwiesen, konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine intraabdominelle Produktion von Leptin zum pathophysiologischen Mechanismus und Erscheinungsbild einer Leberzirrhose und Aszitesbildung beitragen könnte (117). In vorliegender Arbeit konnte diese Erkenntnis bestätigt werden. Ein SAR-Wert im Median in vorliegender Arbeit von 0,6 wurde ermittelt und unterstreicht die Hypothese der Sezernierung von Leptin durch intra-abdominelle peritoneale Adipozyten. Zuvor konnten experimentelle Studien zeigen, dass omentale Adipozyten Leptin mRNA exprimieren und Leptin synthetisieren, obwohl ihre Leptin Sekretionskapazität niedriger ist, als jene von

subkutanen Adipozyten (118;119). Klinische Studien gaben bisher Hinweise darauf, dass Adipozyten der Peritonealhöhle Leptin produzieren könnten. Insbesondere wurde gezeigt, dass sich die peritoneale Clearance von Leptin, bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 1,6-mal höher darstellte als erwartet (120). Bei Patienten, die Peritonealdialyse benötigen, war das Dialysat/Plasma Verhältnis von Leptin doppelt so hoch, als es auf Basis des Molekulargewichts von Leptin zu vermuten gewesen wäre (121). Es kann zusammengefasst werden, dass die omentale Produktion von Leptin mit großer Wahrscheinlichkeit zum metabolischen und pathophysiologischen Bild der Leberzirrhose- und Aszitesentwicklung und -unterhaltung beiträgt.

Erstmalige Detektion von Resistin und Visfatin in peritonealer Flüssigkeit

Zwar existieren Erkenntnisse und Studien über die Beziehung von Leberzirrhose, Peritonitis, hepatozellulärem Karzinom und den Serumkonzentrationen von Adipokinen, die Datenlage über Messungen im Aszites sind jedoch gering. Darüberhinaus ist die Verbindung von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit zu ihren Serumkonzentrationen, sowie zu klinischen-, anthropometrischen- oder Laborparametern noch nicht erforscht worden. Aufgrund dieser Wissenslücke, erschien es wichtig, in diesem Bereich neue Daten bereit zu stellen. Alle der untersuchten Adipokine wurden reichlich in peritonealer Flüssigkeit mit signifikanten Mengen detektiert. Dies wurde bisher weder für Resistin noch für Visfatin demonstriert.

Bedeutung peritonealer Adipokine bei Patienten mit Leberzirrhose?

Jedes der Adipokine hatte einen spezifischen SAR (Adiponektin > Resistin > Visfatin > Leptin). Während der SAR für Leptin und Resistin nicht von dem Vorhandensein oder der Abwesenheit einer Leberzirrhose abhängig war, konnte gezeigt werden, dass der SAR-Wert des Adiponektin bei Leberzirrhosepatienten erhöht und der SAR-Wert von Visfatin signifikant erniedrigt war. Betrachtet man den SAR-Wert des Adiponektins in Zusammenhang mit Leberzirrhose, so darf nicht der Schluss gezogen werden, dass erhöhte Serumkonzentrationen an Adiponektin für eine Leberzirrhose prädisponieren. Das Gegenteil scheint der Fall zu sein. Rogers et al. fassten diese Erkenntnisse zusammen. Eine steigende Anzahl an Daten beschreibt, dass eine zunehmende Adiponektinproduktion im Fettgewebe und eine verringerte Expression an hepatischen Adiponektin-Rezeptor (Adipo-R siehe 2.3.) mit der Entwicklung einer alkoholischen

Leberzirrhose in mehreren Mausmodellen einhergeht. Weiter wurde in mehreren Studien demonstriert, dass Adiponektin eine protektive Rolle in der Entwicklung einer alkoholischen Leberzirrhose einnimmt. Der hepato-protektive Effekt von Adiponektin ist dabei hauptsächlich auf die Koordinierung mehrerer Signalwege zurückzuführen, die in der Leber zu erhöhter Fettsäureoxidation, reduzierter Lipidsynthese und damit einer Prävention gegen Leberverfettung führen (122). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Hypoadiponektinämie für die Akkumulation von hepatischem Fett und möglicherweise für den entzündungsassoziierten fibrotischen Umbau in der Leber verantwortlich ist (123-125). Es kann zusammengefasst werden, dass Adiponektin im Serum in Bezug auf die Entwicklung einer Leberzirrhose einen anti-fibrosierenden Faktor darstellt (126).

Nicht erhöhte Serumkonzentrationen an Adiponektin, sondern erniedrigte Asziteskonzentrationen an Adiponektin lassen die erhöhten SAR-Werte bei Patienten mit Leberzirrhose wahrscheinlich erklären. Dies führt zu dem Schluss, dass erniedrigte Konzentrationen an Adiponektin im Aszites als Marker für eine zirrhotische Genese des Aszites dienen könnten. So bestände die Möglichkeit, dass niedrige Konzentrationen an Adiponektin im Aszites für eine portale Genese in Folge einer Leberzirrhose sprechen, während hohe Konzentrationen an Adiponektin im Aszites eine Leberzirrhose unwahrscheinlich machen und eher auf eine kardiale oder maligne Genese des Aszites hinweisen könnten. Gegen diese Vermutung spricht, dass möglicherweise die Konzentrationen an Adiponektin im Aszites bei malignen und kardialen Erkrankungen ebenfalls erniedrigt sein könnten. Studien hatten verringerte Adiponektinkonzentrationen im Serum bei malignen Erkrankungen wie dem kolorektalem Karzinom (127) und Prostatakarzinom (128), sowie Koronararteriosklerose (129) gezeigt, so dass verringerte Adiponektinkonzentrationen im Aszites ebenfalls möglich wären. Jedoch könnte hier möglicherweise der SAR-Wert den entscheidenden Unterschied erbringen, sofern Leberzirrhose und -entzündung, wie vorliegende Arbeit vermuten lässt, zu einer verringerten peritonealen Produktion an Adiponektin bzw. zur erhöhten Resorption von Adiponektin durch peritoneale Adipozyten führt und dies bei kardialen und malignen Erkrankungen nicht der Fall wäre. Diese Hypothese könnte dadurch erklärt werden, dass es weitreichend anerkannt ist, dass Adiponektin ein anti-inflammatorisches Molekül darstellt (130;131). Bei Entzündungsprozessen in der Leber mit nachfolgenden zirrhotischen Umbauvorgängen würde man eher pro-inflammatorische Adipokine im Aszites erwarten, wie in vorliegender Arbeit mit Resistin bei Patienten mit Peritonitis demonstriert und umgekehrt eine Supprimierung und Verdrängung von anti-

inflammatorischen Molekülen, wie Adiponektin, annehmen. Da es bisher keine weiteren Studien zu Messungen von Adiponektin im Aszites in diesem Bereich gibt, wären hier weiterführende Untersuchungen notwendig.

Gleiches gilt für die Messung von Visfatin in peritonealer Flüssigkeit. Auch hier gibt es keine vergleichenden Studien. Die niedrigen SAR-Werte scheinen in diesem Falle jedoch überwiegend auf einen reduzierten Serumspiegel an Visfatin bei Patienten mit versus ohne Leberzirrhose zurückzuführen sein. Jarrar et al. untersuchten eine Gruppe von 95 Patienten (26 NASH, 19 „simple steatosis“ (SS), 38 „obese control“ (OC), 12 „non-obese control“ (non-OC)) (132). Dabei wurden in den Gruppen NASH, SS und OC signifikant höhere Visfatinkonzentrationen im Vergleich zu Non-OC festgestellt (132). Dies überrascht nicht, da bereits übereinstimmend bekannt ist, dass Fettleibigkeit mit hohem viszeralem Fettanteil zu erhöhter Visfatinproduktion führt (91). Jedoch erbrachte der Vergleich von Patienten mit NASH versus SS und OC deutlich erniedrigte Konzentrationen an Visfatin in der NASH Gruppe (132). Es scheint, dass der Entzündungsprozess in der Leber bei Patienten mit NASH, der in der Folge zu zirrhotischem Umbau führen kann, mit verringerten Visfatinkonzentrationen im Serum assoziiert ist. Dies ist insofern überraschend, da übereinstimmend bekannt ist, dass Visfatin ein pro-inflammatorisches Molekül darstellt. Jarrar et al. stellten zudem fest, dass IL-6, als pro-inflammatorisches Molekül bekannt, ebenfalls bei NASH Patienten vermindert exprimiert wurde (132). IL-6 und Visfatin stehen wohl in unmittelbarem Zusammenhang. So induziert Visfatin die Produktion von IL-6 in menschlichen CD14+ Monozyten, während IL-6 für die Regulation der Visfatin Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten zuständig ist (132). Daraus kann gefolgert werden, dass sowohl Visfatin, als auch IL-6 eine noch unbekannte Rolle in der Entwicklung einer NASH zukommen könnte (132). Es scheint, dass der hepatoprotektive Effekt von IL-6 und damit einhergehend von Visfatin bei Patienten mit NASH aufgehoben ist (132). Wenn man bedenkt, dass NASH eng mit der Entwicklung einer Leberzirrhose in Zusammenhang steht (133), überrascht es nicht, dass in vorliegender Arbeit die Visfatinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit Leberzirrhose ebenfalls signifikant erniedrigt waren und damit auch der erniedrigte SAR-Wert bei Patienten mit Leberzirrhose auf die verminderten Serumkonzentrationen an Visfatin zurückgeführt werden könnte.

Betrachtet man die Resistinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit Leberzirrhose, so stellten Yagmur et al. eine positive Korrelation zwischen Resistin auf der einen Seite und systemischen Entzündungsmarkern (z.B. TNF oder CRP), Schweregrad der Lebererkrankung und portaler Hypertension auf der anderen Seite fest. Diese Befunde

korrelierten weiter mit dem Phänomen der Insulinresistenz bei Patienten mit Leberzirrhose (134). Da in dieser Studie die Resistinkonzentrationen im Aszites nicht gemessen wurden, erscheint die Interpretation dieser Befunde schwierig. Eine eindeutige Korrelation zwischen Resistinkonzentrationen im Serum und dem Grad der Leberzirrhose konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Resistinkonzentration im Serum konnten Kakizaki et al. ebenfalls bei Patienten mit Leberzirrhose feststellen. Tsochatzis et al. beschreiben demgegenüber eine reduzierte Resistinkonzentration im Serum bei Patienten mit moderater oder schwerer Leberfibrose (Stadium 4-6) (135). Diese Kontroverse unterstreicht die Bedeutung der Messung von Asziteskonzentrationen und der damit einhergehenden Möglichkeit der Berechnung des SAR-Wertes. Es sei jedoch erwähnt, dass in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung des SAR-Wertes für Resistin, im Unterschied zum SAR-Wert von Adiponektin und von Visfatin, wie beschrieben, ebenfalls keine signifikante Korrelation mit Ätiologie oder Schweregrad einer Leberzirrhose bestand.

Eine Leberzirrhose ist mit verstärktem Katabolismus assoziiert, was wiederum zu erhöhtem Energieverbrauch führt (136). Niedrige Leptinkonzentrationen führen zu einer Energiekonservierung und einer anabolen Stoffwechsellaage. Bei hohen Leptinkonzentrationen besteht der umgekehrte Fall. Vorangehende Studien konnten daher zeigen, dass zirkulierende Leptinkonzentrationen bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose erhöht sind (137-140). Henriksen et al. sahen als Erklärung vorrangig die Kombination von verminderter renaler Eliminierung und erhöhter Freisetzung von Leptin aus dem Fettgewebe an (138). Zwar wiesen in vorliegender Arbeit Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose höhere Serum- und Asziteskonzentrationen an Leptin im Vergleich zu Patienten ohne Leberzirrhose auf, der Unterschied war jedoch gering und nicht statistisch signifikant. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ein anhaltender Katabolismus jedoch ebenfalls zu Gewichtsverlust führt und der Leptinspiegel eng mit dem BMI korreliert ist. Es wäre deshalb möglich, dass die Entwicklung einer Zirrhose auch zu verminderten Leptinkonzentrationen führen kann. Dabei könnte es aufgrund einer anhaltenden negativen Energiebilanz, verursacht durch die Kombination von reduzierter Energieaufnahme bzw. -verwertung und dem erhöhten Verbrauch an Energiereserven, ebenso zu einer Abnahme der Leptinkonzentrationen kommen, um eine ausgeglichene Energiebilanz aufrecht erhalten zu können. Diese Hypothese konnte in vorliegender Studie bei Patienten mit viraler Hepatitis und langjähriger Erkrankung ebenfalls bestätigt werden. Die Leptinkonzentrationen im Aszites waren bei Patienten, die an chronischer Hepatitis B und C erkrankt waren, am niedrigsten, während sie bei Patienten mit kryptogener Leberzirrhose am höchsten waren. Der

Unterschied zwischen Patienten mit kryptogener Leberzirrhose versus Patienten ohne Leberzirrhose und viral bedingter Leberzirrhose war dabei statistisch signifikant. Wenn man in Betracht zieht, dass die meisten Fälle von kryptogener Leberzirrhose wahrscheinlich mit NASH in Zusammenhang stehen sind, so liegt es nahe, dass die erhöhten Leptinkonzentrationen in dieser Gruppe durch eine vermehrte intra-abdominelle Fettmasse und der gesteigerten Leptinproduktion durch omentale Adipozyten erklärt werden könnte. Tsochatzis et al. stellten fest, dass bei Patienten mit Hepatitis B oder Hepatitis C induzierter Leberzirrhose, die Leptinkonzentrationen im Serum verglichen mit Patienten mit NASH signifikant erniedrigt waren, was die beschriebene Vermutung unterstreicht (135).

Bezüglich der Frage, inwieweit eine Adipokinexpression und Leberzirrhose zusammenhängen, kann gefolgert werden, dass die vorliegende Arbeit eine eindeutige Assoziation zwischen diesen beiden Variablen demonstriert. So geben nicht nur die Konzentrationen an Adiponektin und Visfatin im Aszites und Serum, sowie insbesondere deren SAR-Wert, Hinweise auf das Bestehen und die Entwicklung einer Leberzirrhose. Leptinkonzentrationen scheinen zudem Informationen über die Genese einer Leberzirrhose zu zeigen. Eine Kontroverse der bestehenden Studienlage zu Serumkonzentrationen von Resistin und der Manifestation einer Leberzirrhose zeigen die Bedeutung der Messung von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit und der damit verbundenen Möglichkeit der Berechnung eines SAR-Wertes mit weitergehender Information über lokale und systemische pathophysiologische Zusammenhänge von Adipokin und Lebererkrankung.

Peritoneale Adipokine als zukünftige Markerproteine? Bedeutung bei Patienten mit HCC?

Bei der Betrachtung des Parameters BMI stellte Leptin das einzige Adipokin dar, das positiv mit dem BMI korrelierte. Während seit langem bekannt ist, dass sich die Leptinkonzentrationen im Serum mit steigendem BMI ebenfalls erhöhen, wurde diese Beziehung bisher nicht für Konzentrationen im Aszites gezeigt. In der vorliegenden Arbeit erreichte die Korrelation der Adiponektinkonzentrationen im Serum und dem BMI ebenfalls statistische Signifikanz. Patienten mit einem BMI ≥ 25 kg/m² wiesen im Schnitt doppelt so hohe Adiponektinkonzentrationen im Aszites auf, als Patienten mit BMI < 25 kg/m². Jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,07$). Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch einen SAR Median von 0,6 bzw. einen SAR

Mittelwert von 1,1 erklären. Bei einem SAR-Wert Mittelwert von 1,0 wäre die Vorraussetzung geschaffen, den peritonealen Leptinwert ebenfalls als Marker für systemische metabolische Vorgänge im menschlichen Körper, wie exemplarisch den BMI, einzusetzen.

Bei der Frage inwieweit Adipokine als potentielle Markerproteine für eine peritoneale Tumorausbreitung dienen könnten, ergaben die Korrelationsanalysen bei Patienten mit versus ohne HCC in Bezug auf Serum-, Asziteskonzentrationen oder SAR-Wert der einzelnen Adipokine keine signifikanten Korrelationen. Die Adipokine Leptin und Adiponektin sind bis dato die beiden einzigen Adipokine zu denen Untersuchungen in Verbindung mit malignen Tumoren vorliegen.

Buyukberber et al. führten bisher als einzige Messungen zu Leptin im Aszites bei malignen Erkrankungen durch und beschrieben in einer Untersuchung mit 97 Personen (35 Tumorerkrankung, 30 Leberzirrhose, 12 Tuberkulose und 20 gesunde Kontrollen) eine signifikante Abnahme der Leptinkonzentrationen im Serum und Aszites bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen versus kranken und gesunden Kontrollen (141). Der Unterschied war dabei zwischen der Gruppe mit maligner Erkrankung und Tuberkulose am größten. Als Erklärung für erniedrigte Leptinkonzentrationen bei Patienten mit Tumorerkrankungen könnte eine durch den Tumor produzierte Freisetzung von Mediatoren sein, die die Leptinsekretion hemmen könnte. Weiter liegt es nahe, dass ebenso eine Gewichtsabnahme im Zuge von Unterernährung und Tumorkachexie zu verminderten Leptinkonzentrationen führen kann. Leptin wurde deshalb von Buyukberber et al. als Marker zur Unterscheidung eines benignen von einem malignen Aszites vorgeschlagen (141). Ein Erklärungsansatz warum es keinen Unterschied in den Gruppen HCC versus Nicht-HCC in vorliegender Arbeit gegeben hat, wäre eine unterschiedliche BMI-Verteilung zwischen der HCC und Nicht-HCC Gruppe. Es ist bekannt, dass ein erhöhter Körperfettanteil mit einem steigenden Leptinwert einhergeht (31;33;35). Da in dieser Arbeit die Patientengruppe mit HCC einen um 2,1 Prozentpunkte höheren BMI aufwies als die Vergleichsgruppe, liegt der Schluss nahe, dass die Gruppe mit HCC BMI-bedingt von Grund auf höhere Leptinspiegel aufwies und die Hypothese einer Leptinsupprimierung wie sie Buyukberber et al. bei malignen Erkrankungen beschreiben, in diesem Falle zu ausgeglichenen Werten zwischen den beiden Gruppen geführt haben könnte. Ein weiterer Grund könnte sein, dass in der Untersuchung von Buyukberber et al. überwiegend gynäkologische Tumorentitäten in die Untersuchung mit einbezogen wurden und kein Fall eines HCC. Wang et al. stellten in einer Studie mit 31

Leberzirrhosepatienten mit HCC, 26 Leberzirrhosepatienten ohne HCC und 25 Kontrollen leicht erhöhte Leptinkonzentrationen im Serum in den Gruppen Leberzirrhose mit HCC und ohne HCC versus Kontrollen fest, jedoch keine Unterschiede zwischen den ersten beiden genannten Gruppen. Sie folgerten daraus, dass eine Assoziation zwischen der Entwicklung eines HCC und Leptinkonzentrationen im Serum unwahrscheinlich scheint (142). Auch die vorliegende Arbeit unterstützt am ehesten diese These. Dennoch scheint Leptin in der Pathogenese des HCC beteiligt zu sein. Ribatti et al. beschreiben, dass eine verstärkte Rezeptordichte an Leptin „Obese-Rezeptor“ Ob-R (siehe 2.2.) mit Angiogenese und Tumorprogression bei Patienten mit HCC vergesellschaftet ist und dass ein Anti-Leptin-Antikörper Einfluss auf die angiogenetische Tumoraktivität bei HCC haben kann (143). Die Untersuchungen von Wang et al. bestätigen diese Erkenntnis, darüberhinaus konnten Wang et al. feststellen, dass eine hohe Ob-R Dichte mit höheren Überlebenszeiten bei HCC assoziiert ist, wenngleich eine verstärkte Leptinrezeptorexpression einen HCC-begünstigenden Faktor darstellt (144). Weitere spezifische Tumorentitäten konnten mit erhöhten Leptinkonzentrationen im Serum in Zusammenhang gebracht werden. Hoda et al. zeigten, dass chronisch erhöhte Leptinkonzentrationen das Wachstum von Prostatakrebs via „Mitogen-activated Protein Kinase“ (MAPK) und „Phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3-K) Signalweg verstärken können (145). Damit besitzt Leptin die Fähigkeit mitogene und anti-apoptotische Signalwege zu beeinflussen und könnte ein Ziel für zukünftige pharmakologische Krebstherapie darstellen (145). Dass eine Zellproliferation von Prostatakarzinomzellen durch erhöhte Leptinkonzentrationen verstärkt werden kann, konnte bereits durch Somasunder et al. beobachtet werden (146). Leptin erhöhte zudem das Wachstum und die Metastasierungsfähigkeit, sowohl beim cholangiozellulären Karzinom (147), als auch beim kolorektalem Karzinom (148).

Bisher gibt es keine vergleichenden Untersuchungen von Adiponektinkonzentrationen im Serum und Aszites bei Patienten mit HCC. Jedoch konnte in Untersuchungen in Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom festgestellt werden, dass bei Patienten, die sich einer radikalen Prostataektomie unterzogen, niedrigere Adiponektinkonzentrationen im Serum mit höhergradigem Prostatakarzinom assoziiert waren (149). Weiter sind Adiponektinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit Mammakarzinom (150-152), Endometriumkarzinom (153), Magenkarzinom (154) und kolorektalem Karzinom (155) vermindert. Es kann deshalb zusammengefasst werden, dass Adiponektin eine biologische Verbindung zwischen Fettleibigkeit und erhöhtem Tumorrisiko darstellt (156;157). Adiponektin könnte ein Krebsrisiko durch seinen bekannten Effekt auf die Insulinresistenz erzeugen. Möglicherweise hat es auch

direkten Einfluss auf den Tumor (156). Fettleibigkeit ist ein Risikofaktor bei der Entwicklung der eben genannten Karzinome. Ein HCC ist dagegen nicht typischerweise mit Fettleibigkeit assoziiert, so dass hier möglicherweise zirkulierende Adiponektinkonzentrationen einen geringeren Einfluss auf die Tumorentwicklung und -progression besitzen und deshalb auch in vorliegender Arbeit keine signifikanten Korrelationen in der Subgruppenanalyse HCC versus Nicht-HCC und Adiponektinkonzentrationen bestanden. Interessant in diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung einer Population von Patienten mit HCC, die im Rahmen einer NASH ein HCC entwickelt haben. Hier wäre es plausibel, dass Adiponektin einen relevanten Faktor in der Tumorentwicklung spielen könnte. Dies ist um so mehr von Bedeutung, wenn man bedenkt, dass angesichts der steigenden Zahl an fettleibigen Personen und Typ-2 Diabetikern das Risiko für ein NASH-assoziiertes HCC mit großer Wahrscheinlichkeit weiter ansteigen wird (158). Ma et al. beobachteten bereits, dass verminderte Adiponektinexpression eine Rolle in der Entwicklung einer „non-alcoholic fatty liver disease“ (NAFLD), von einfacher Leberverfettung hin zu NASH spielt (159). Adachi et al. konnten demgegenüber zeigen, dass der T-cadherin Rezeptor von Adiponektin (siehe 2.3) selektiv in Endothelzellen von Kapillaren bei HCC Patienten exprimiert wird (160). Die Expression steigt dabei mit Tumorprogression an (160). Es konnte gefolgert werden, dass der T-cadherin Rezeptor und eine Adiponektinbindung eine wichtige Rolle in der Angiogenese des HCC und weiteren Signalwegen darstellen könnten (160).

Einflussnahme von Adipokinen auf peritoneale Entzündungsprozesse?

Bei allen Adipokinen, außer bei Resistin, lag eine signifikante Korrelation zwischen Serum- und Asziteskonzentrationen vor. Dies liegt möglicherweise daran, dass eine lokale peritoneale Entzündung eine entscheidende Variable darstellt, die Resistinkonzentrationen in peritonealer Flüssigkeit beeinflusst und somit zu einem Ungleichgewicht zwischen Serum- und Asziteskonzentration führen kann. Da Resistin ein kleines Molekül (12,5 kDa) ist, könnte die Entzündung des Peritoneums die Permeabilität von Resistin aus dem peripheren Blutstrom in die Peritonealhöhle beschleunigen. Die Subgruppenanalyse zeigte bei Patienten mit Peritonitis signifikant höhere Resistinkonzentrationen im Aszites im Vergleich mit Patienten ohne Peritonitis. Weiterhin waren Serum- und Asziteskonzentrationen an Visfatin nicht nur positiv untereinander korreliert, sondern taten dies ebenfalls mit systemischen Entzündungsmarkern wie CRP und peripherem weißen Blutbild. Es scheint, dass

Resistin einen lokalen Entzündungsmarker repräsentiert, während Visfatin das Ausmaß des systemischen Entzündungsprozess darstellt. Diese Beobachtung könnte durch drei Hypothesen erklärt werden. Visfatin, ein 52 kDa schweres Molekül, könnte bei Entzündungsprozessen weniger permeabel als Resistin sein. Peritoneale Adipozyten könnten auf den Entzündungsreiz mit einer unterschiedlich hohen Ausschüttung an Resistin und Visfatin reagieren und könnten weiter diese in verschiedenem Maße rückresorbieren. Otero et al. stellten fest, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis die Visfatinkonzentrationen im Serum anstiegen. Demgegenüber blieben die Resistinkonzentrationen im Serum im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe unverändert (161). Lago et al. folgerten, dass Resistinkonzentrationen im Serum die hohen lokalen Konzentrationen innerhalb des Gelenks nicht widerspiegeln (162). Dies unterstreicht, in Zusammenschau mit den Beobachtungen dieser Arbeit, die Bedeutung von Visfatin als möglicher systemischer Entzündungsmarker, während Resistin scheinbar spezifisch im lokalen Entzündungsbereich von Bedeutung ist. Bei Patienten mit Peritonitis könnte demnach Resistin als peritonealer Entzündungsmarker dienen. Dennoch sei in Erinnerung gerufen, dass Resistin und Visfatin die beiden einzigen Adipokine waren, die untereinander bezüglich Serum- und Asziteskonzentrationen korrelierten. Zusammenfassend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der lokale intraabdominelle Entzündungsprozess in diesem Zusammenhang die wichtigste Variable zu sein scheint.

Ein frühes und verlässliches diagnostisches Kriterium für Patienten mit akuter Peritonitis ohne typische klinische Symptome wäre von großer Bedeutung (163). Während den ersten Tagen einer Peritonitis ist die Diagnosesicherung basierend auf peritonealer Pleozytose, neutrophiler Granulozytose und Entzündungsmarkern wie CRP oder IL-6 in nicht allen Fällen effizient (163). Aus diesem Grunde wäre die Etablierung von zusätzlichen verlässlichen und sicheren Markern im Aszites wünschenswert. Nicht nur bei Patienten mit einer Peritonitis und zugrundeliegender Lebererkrankung, sondern ebenfalls bei Patienten mit Peritonealdialyse wäre ein diagnostischer Marker von großer Bedeutung. Kolonko et al. evaluierte aus diesem Grunde 47 Patienten mit Peritonealdialyse (24 davon mit Peritonitis, bestätigt durch klinische oder mikrobiologische Tests und 23 davon ohne Zeichen und Symptome einer Entzündung) hinsichtlich der Adiponektin- und Leptinkonzentrationen im Serum und Aszites. In der Peritonitisgruppe konnten deutlich erhöhte Werte (insbesondere) an Adiponektin und (in zweiter Linie) an Leptin im Aszites ohne Veränderung der Serumparameter festgestellt werden. Experimentell existiert in diesem Zusammenhang

bisher lediglich eine Untersuchung. Bei Zymosan-induzierter peritonealer Entzündung kam es bei Mäusen nach zwei Stunden zu einer Verdopplung der Resistinkonzentrationen im Aszites bzw. nach sechs Stunden zu einer Verdreifachung des Resistinausgangswertes, ehe nach 24h sich der Resistinwert wieder dem Ausgangsniveau annäherte. Die Resistinkonzentrationen im Serum änderten sich dagegen kaum. Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei Resistin um einen lokalen, peritonealen und weniger um einen systemischen Entzündungsmarker handelt. Im Unterschied dazu konnte bei Adiponektin keine Zymosan-induzierte Erhöhung des Ausgangswertes im Aszites erreicht werden, es wurde gar ein leicht abnehmender Trend bei den Serumwerten festgestellt (164).

Weitere Studien wären notwendig, um die Verlässlichkeit von Resistins und Visfatin in Bezug auf die Diagnosestellung einer peritonealen Entzündung zu überprüfen. Dennoch kann zum einen gefolgert werden, dass Adipokine mit großer Wahrscheinlichkeit Einfluss auf den peritonealen Entzündungsprozess nehmen, zum anderen dass die Einflussnahme ebenfalls von der Ursache der Peritonitis abhängen könnte. Da unter den Adipokinen Resistin am ehesten als ein lokaler Entzündungsmarker angesehen werden dürfte und die pro-inflammatorische Wirkung von Resistin bereits weitreichend anerkannt ist, demonstriert die vorliegende Arbeit, dass sich unter den Adipokinen Resistin wohl am ehesten als peritonealer Entzündungsmarker eignen könnte. Sollte sich jedoch Resistin als frühzeitiger Marker einer Peritonitis als zu wenig sensitiv oder zu unspezifisch erweisen, so bleibt dennoch die spannende Frage, inwieweit durch Modulierung oder Supprimierung der Resistinexpression eine therapeutische Unterdrückung des Entzündungsprozesses bei Patienten mit Peritonitis möglich wäre.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende klinisch prospektive und experimentelle Arbeit gibt Einblicke in die Rolle viszeraler Adipokine bei gastrointestinalen Erkrankungen mit und ohne entzündliche Komponente und eröffnet ein neues Forschungsgebiet im Bereich der Gastroenterologie und Hepatologie. Im Rahmen einer 1,5-jährigen (10/06 – 05/08) Sammlung und Charakterisierung eines Patientenkollektivs, insbesondere im Bereich der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, aber ebenso mit freundlicher Unterstützung der Kliniken und Polikliniken der Inneren Medizin II, Hämatologie/Onkologie und Strahlentherapie, gelang es 128 Patienten in die Studie

aufzunehmen, wovon 96 die Einschlusskriterien erfüllten. Die Verbindung von Adipokinen in peritonealer Flüssigkeit zu ihren Serumkonzentrationen, sowie klinischen-, anthropometrischen- oder laborchemischen Parametern ist bisher noch nicht erforscht worden. Bezüglich der Eingangshypothese „Adipokine könnten durch peritoneales intra-abdominelles Fettgewebe sezerniert werden“ konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass nicht nur alle Adipokine im Aszites in signifikanten Mengen detektiert werden konnten, sondern ebenso, dass eine peritoneale Produktion von Adipokinen durch omentale Adipozyten als sehr wahrscheinlich anzunehmen ist. Die pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften der Adipokine sind bisher am ehesten für Resistin und Visfatin, als überwiegend pro-inflammatorische Proteine, und Adiponektin, als weitestgehend anti-inflammatorisches Protein, untersucht. Jedoch wurde bisher nicht demonstriert, dass Adipokine ebenfalls einen wichtigen Beitrag in der Kontrolle einer intraabdominellen Entzündung leisten könnten. Insbesondere Resistin scheint als lokaler peritonealer Entzündungsmarker in Frage zu kommen, während Visfatin mit systemischen Entzündungsparametern wie CRP und peripherem weißen Blutbild korreliert. In der Differenzierung der Genese des Aszites vermag Adiponektin möglicherweise am ehesten zwischen portalem oder nicht-portalem Aszites unterscheiden zu können, wenngleich diese Hypothese noch nicht näher untersucht wurde. Die Versuche der Etablierung eines Tumormarkers unter den Adipokinen stehen noch am Anfang, auch in vorliegender Arbeit konnte keine Korrelation zwischen HCC-Patienten und Adipokinkonzentrationen gefunden werden. Jedoch scheinen in verstärktem Maße die Endothelzellen der Kapillaren eines HCC mit Adipokinrezeptoren (Leptinrezeptor Ob-R und Adiponektinrezeptoren Adipo-R) ausgestattet zu sein und können damit Einfluss auf Progression und Wachstum des Tumors sowie Patientenüberlebenszeit nehmen. Der Leptinwert könnte zudem das Potential haben, als Marker für systemische metabolische Vorgänge im menschlichen Körper, exemplarisch dem BMI, zu wirken. Es konnte der bekannte Zusammenhang zwischen Leptinkonzentrationen im Serum und dem BMI in dieser Arbeit bestätigt werden. Jedoch konnte zudem eine Korrelation zwischen der Leptinkonzentration im Aszites und dem BMI gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte ferner demonstriert werden, dass sowohl das Vorhandensein, als auch die Abwesenheit einer Leberzirrhose die verschiedenen Adipokinkonzentrationen beeinflusst. Weiter scheint sich die Genese der Leberzirrhose unterschiedlich auf die Adipokinexpression auszuwirken. Sowohl der aufgezeigte Zusammenhang zwischen Adipokinen und Leberzirrhose, als auch das Zusammenspiel von Adipokinen und der Entstehung einer Peritonitis eröffnet die Hypothese, dass die Entwicklung neuer Strategien, die auf das

Adipokinsystem Einfluss nehmen könnten, zur Verzögerung der Entwicklung einer Leberzirrhose oder einer Peritonitis beitragen könnten. Aus diesem Grunde sollten zukünftige klinische Studien und experimentelle Grundlagenforschung die Rolle des viszeralen Fettgewebes und die einzelnen Adipokinen bei Lebererkrankungen, portaler Hypertension und während abdomineller Entzündung näher untersuchen.

I. Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
Acrp30	Adipozyt complement-related protein 30
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AgRP	Agouti related protein
AMP	Adenosin -5'-monophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
aP2	Adipocyte Protein 2
apM1	Adipose most abundant transcript 1
APPL1	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1)
BMI	Body Mass Index
Bzw.	Beziehungsweise
CART	Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
CD	Cluster of differentiation
CRP	C – reaktives Protein
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
EASL	European Association for the study of the liver
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Gbp 28	Gelatin binding protein 28
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMW	High molecular weight
HRP	Horseradish Peroxidase
HRS	Hepatorenales Syndrom
HSL	Hormon sensitive Lipase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
JAK-2	Janus Kinase -2
IGF – 1	Insulin-like growth factor – 1
IL	Interleukin
LPL	Lipoprotein Lipase

MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
NAD	Nicotinamid adenine dinucleotide
nadV	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	Nuklearfaktor- κ B
NOR	Norepinephrin
NPY	Neuropeptid Y
Ob-R	Obese Rezeptor (Leptinrezeptor)
PAI – 1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBC	Primär biliärer Zirrhos
PBEF	Pre- B-Cell Colony-enhancing factor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMN	Polymorphonuclear leukocyte count
POMC	Proopiomelancortin
PPAR – α	Peroxisomal proliferierenden aktivierenden Rezeptor- α
Rpm	Rounds per minute
SAG	Serum/Aszites – Gradienten
SAR	Serum – Aszites Ratio
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
SEM	Standard error oft the mean
SH2	Scr Homolog-2
SOCS 3	Suppressor of cytokine signaling
STAT 3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT 5	Signal transducer and activator of transcription 5
SCD1	Stearoyl-Coenzym-A Desaturase-1
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
UCP	Uncoupling Protein (Hier: Spaltprodukt Norepinephrin)

VCAM-1	Vascular cell-adhesion molecule 1
VLDL-c	Very-low-density lipoprotein-cholesterol
ZAG	Zink-(alpha)-2-Glycoprotein
z.B.	Zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Vergleich von Fettgewebe einer normalgewichtigen Person (BMI 24 kg/m²) und einer fettleibigen Person (BMI 43 kg/m²).
Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhoof A, Brichard SM. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(3):E656-E665.
- Abbildung 2: Zusammenspiel und Regulierung von Lipolyse und Lipogenese durch Insulin und Leptin.
In Anlehnung an: Yokaichiya DK, Galembeck E, Torres BB, Da Silva JA, de Araujo DR. Insulin and leptin relations in obesity: a multimedia approach. *Adv Physiol Educ* 2008; 32(3):231-236.
- Abbildung 3: Systemische Wirkungen von Adiponektin
In Anlehnung an: Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007; 56(5):1198-1209.
- Abbildung 4: Die Struktur von Adiponektin bestehend aus vier Domänen.
In Anlehnung an: Ukkola O, Santaniemi M., Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med.* 2002 Nov;80(11):696-702. Epub 2002 Sep 10.
- Abbildung 5: Adiponektin und Resistin Signalweg in der Leber.
In Anlehnung an: Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 2008; 22(5):1023-1031.
- Abbildung 6: Vermutete systemische Wirkung von Resistin.
In Anlehnung an: Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med.* 2004 Apr;255(4):439-47.
- Abbildung 7: Systemische und lokale Wirkungen von Visfatin.
In Anlehnung an: Sethi JK, Vidal-Puig A. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med* 2005; 11(8):344-347.
- Abbildung 8: Schlottmann – Nadel
Schlottmann K, Gelbmann C, Grüne S, Lock G, Schölmerich J., A new paracentesis needle for ascites and pleural effusion compared with the venous indwelling catheter. A prospective, randomized study], *Med. Klin (Munich).* 2001 Jun 15;96(6):321-4.
- Abbildung 9: Korrelationskurve zwischen Serum Adiponektin und Aszites Adiponektin
- Abbildung 10: Korrelationskurve zwischen Serum Leptin und Aszites Leptin

- Abbildung 11: Korrelationskurve zwischen WBC und Konzentration von Resistin im Aszites
- Abbildung 12: Korrelationskurve zwischen Serum Resistin und Aszites Resistin
- Abbildung 13: Korrelationskurve zwischen Aszites Resistin und Aszites Visfatin
- Abbildung 14: Korrelationskurve zwischen Serum Resistin und Serum Visfatin
- Abbildung 15: Korrelationskurve zwischen Serum Visfatin und Aszites Visfatin
- Abbildung 16: Serum-Aszites Ratio (SAR) von Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin

III. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Charakterisierung der Studienkohorte
- Tabelle 2: Child-Pugh-Score Kriterien
Nemec K., Schubert-Zsilavec M, Ezetimib und Rosuvastatin, ÖAZ Aktuell (Ausgabe 20/2003)
- Tabelle 3a: Studiengruppe 1 + 2 - Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose
- Tabelle 3b: Studiengruppe 3 - Diagnosekriterien zur Klärung der Ätiologie der Leberzirrhose
In Anlehnung an: Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann WH. [Liver cirrhosis--1: Pathogenesis and diagnosis]. Dtsch Med Wochenschr 2001; 126(36):975-977.
- Tabelle 4: Ausgewählte Ursachen der Aszitesentwicklung.
In Anlehnung an: Wiest R, Schölmerich J. Aktuelle Diagnostik und Therapie des Aszites. Der Gastroenterologe 2008; 3(1):57-67.
- Tabelle 5: Zusammenfassung der bereitgestellten Lösungen und Reagenzien
- Tabelle 6: Charakterisierung der Studienkohorte
- Tabelle 7a: Subgruppenanalyse von Adiponektin und Leptin
- Tabelle 7b: Subgruppenanalyse von Resistin und Visfatin, * $p = 0,003$, Peritonitis vs Keine Peritonitis

IV. Literaturverzeichnis

- (1) Cook J, Fischer E, Boucheix C et al. Mouse monoclonal antibodies to the human C3b receptor. *Mol Immunol* 1985; 22(5):531-539.
- (2) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505):425-432.
- (3) Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3):347-355.
- (4) Andus T, Gross V, Holstege A, Scholmerich J. High interleukin-6 concentrations in hepatic ascites. *Dig Dis Sci* 1994; 39(1):219-220.
- (5) White RT, Damm D, Hancock N et al. Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* 1992; 267(13):9210-9213.
- (6) Pond CM, Mattacks CA. The activation of the adipose tissue associated with lymph nodes during the early stages of an immune response. *Cytokine* 2002; 17(3):131-139.
- (7) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2548-2556.
- (8) Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol* 2007; 28(9):393-399.
- (9) Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005; 40(4):229-242.
- (10) Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008.
- (11) Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 2003; 144(6):2195-2200.
- (12) Maury E, Ehala-Aleksejev K, Guiot Y, Detry R, Vandenhooft A, Brichard SM. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(3):E656-E665.
- (13) Cencello R, Henegar C, Viguerie N et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005; 54(8):2277-2286.
- (14) Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 2005; 54(8):2305-2313.

- (15) Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 2008; 456:1-22.
- (16) Dietze D, Koenen M, Rohrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* 2002; 51(8):2369-2376.
- (17) Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24):14211-14216.
- (18) Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2(2):103-111.
- (19) Schaffler A, Landfried K, Volk M et al. Potential of adipocytokines in predicting peripancreatic necrosis and severity in acute pancreatitis: pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(3):326-334.
- (20) Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research? *Gut* 2005; 54(6):742-744.
- (21) Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2(6):273-280.
- (22) Ahima RS, Osei SY. Adipokines in obesity. *Front Horm Res* 2008; 36:182-197.
- (23) Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18(2):158-168.
- (24) Yokaichiya DK, Galembeck E, Torres BB, Da Silva JA, de Araujo DR. Insulin and leptin relations in obesity: a multimedia approach. *Adv Physiol Educ* 2008; 32(3):231-236.
- (25) Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 2008; 22(5):1023-1031.
- (26) Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS, Havel PJ. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism* 1998; 47(4):429-434.
- (27) Pratley RE, Nicolson M, Bogardus C, Ravussin E. Plasma leptin responses to fasting in Pima Indians. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 1):E644-E649.
- (28) Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2):561-565.
- (29) Chin-Chance C, Polonsky KS, Schoeller DA. Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(8):2685-2691.

- (30) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334(5):292-295.
- (31) Jaworek J, Bonior J, Konturek SJ, Bilski J, Szlachcic A, Pawlik WW. Role of leptin in the control of postprandial pancreatic enzyme secretion. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54(4):591-602.
- (32) Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Jaworek J, Hahn EG. Role of leptin in the stomach and the pancreas. *J Physiol Paris* 2001; 95(1-6):345-354.
- (33) Perez C, Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T et al. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 2004; 53(2):347-353.
- (34) Heymsfield SB, Fong TM, Gantz I, Erond N. Fat and energy partitioning: longitudinal observations in leptin-treated adults homozygous for a *Lep* mutation. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14(2):258-265.
- (35) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83(7):1263-1271.
- (36) Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000; 21(3):263-307.
- (37) Torday JS, Rehan VK. Up-regulation of fetal rat lung parathyroid hormone-related protein gene regulatory network down-regulates the Sonic Hedgehog/Wnt/betacatenin gene regulatory network. *Pediatr Res* 2006; 60(4):382-388.
- (38) Taleb S, Herbin O, it-Oufella H et al. Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12):2691-2698.
- (39) Cervero A, Dominguez F, Horcujadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C. The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(3):297-303.
- (40) Aka N, Atalay S, Sayharman S, Kilic D, Kose G, Kucukozkan T. Leptin and leptin receptor levels in pregnant women with hyperemesis gravidarum. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(4):274-277.
- (41) Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology* 2007; 132(6):2103-2115.
- (42) Munzberg H, Myers MG, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005; 8(5):566-570.
- (43) Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007; 56(5):1198-1209.
- (44) Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270(45):26746-26749.

- (45) Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(1):79-83.
- (46) Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS et al. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2004; 53(9):2473-2478.
- (47) Frystyk J, Berne C, Berglund L, Jensevik K, Flyvbjerg A, Zethelius B. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):571-576.
- (48) Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1):85-89.
- (49) Tonelli J, Li W, Kishore P et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53(6):1621-1629.
- (50) Hug C, Lodish HF. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5(2):129-134.
- (51) Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, Matsuzawa Y. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 16(1):72-75.
- (52) Yamauchi T, Kamon J, Waki H et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7(8):941-946.
- (53) Combs TP, Pajvani UB, Berg AH et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2004; 145(1):367-383.
- (54) Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26(3):439-451.
- (55) Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(28):10308-10313.
- (56) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409(6818):307-312.
- (57) Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109(3):243-256.
- (58) Lee JH, Bullen JW, Jr., Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(3):E625-E632.
- (59) Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004; 304(5674):1154-1158.

- (60) Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10):772-783.
- (61) gawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11):5452-5455.
- (62) Levy JR, Davenport B, Clore JN, Stevens W. Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant Fischer 344 rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(3):E626-E633.
- (63) Hirosumi J, Tuncman G, Chang L et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420(6913):333-336.
- (64) Rajala MW, Qi Y, Patel HR et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53(7):1671-1679.
- (65) Heilbronn LK, Rood J, Janderova L et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4):1844-1848.
- (66) Savage DB, Sewter CP, Klenk ES et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001; 50(10):2199-2202.
- (67) Way JM, Gorgun CZ, Tong Q et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2001; 276(28):25651-25653.
- (68) Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd HM. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300(3):674-678.
- (69) Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(2):561-564.
- (70) Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303(5661):1195-1198.
- (71) Muse ED, Obici S, Bhanot S et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114(2):232-239.
- (72) Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 2004; 114(2):224-231.
- (73) Kawanami D, Maemura K, Takeda N et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(2):415-419.
- (74) Verma S, Li SH, Wang CH et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108(6):736-740.

- (75) Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 2000; 19(15):4046-4055.
- (76) Kusminski CM, da Silva NF, Creely SJ et al. The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(1):270-276.
- (77) Milan G, Granzotto M, Scarda A et al. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 2002; 10(11):1095-1103.
- (78) Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2002; 530(1-3):158-162.
- (79) Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR et al. Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int* 2006; 69(3):596-604.
- (80) Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994; 14(2):1431-1437.
- (81) Martin PR, Shea RJ, Mulks MH. Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *J Bacteriol* 2001; 183(4):1168-1174.
- (82) Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol* 2002; 32(11):3225-3234.
- (83) Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279(49):50754-50763.
- (84) van d, V, Nong Z, O'Neil C, Urquhart B, Freeman D, Pickering JG. Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circ Res* 2005; 97(1):25-34.
- (85) Khan JA, Tao X, Tong L. Molecular basis for the inhibition of human NMPRTase, a novel target for anticancer agents. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(7):582-588.
- (86) Kim MK, Lee JH, Kim H et al. Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol* 2006; 362(1):66-77.
- (87) Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(7):661-662.
- (88) Beltowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 2006; 12(6):RA112-RA119.

- (89) Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307(5708):426-430.
- (90) Adeghate E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem* 2008; 15(18):1851-1862.
- (91) Sethi JK, Vidal-Puig A. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med* 2005; 11(8):344-347.
- (92) Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114(4):275-288.
- (93) Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol* 2008; 83(4):804-816.
- (94) Denzer UW, Lohse AW. [Mini laparoscopy]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133(30):1585-1588.
- (95) Rabe C, Heller J, Sauerbruch T, Caselmann WH. [Liver cirrhosis--1: Pathogenesis and diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126(36):975-977.
- (96) Simonovsky V. The diagnosis of cirrhosis by high resolution ultrasound of the liver surface. *Br J Radiol* 1999; 72(853):29-34.
- (97) Arroyo V, Gines P, Gerbes AL et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. Hepatology* 1996; 23(1):164-176.
- (98) Moreau R, Lebrech D. Review article: hepatorenal syndrome--definitions and diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 3:24-28.
- (99) Atterbury CE, Maddrey WC, Conn HO. Neomycin-sorbitol and lactulose in the treatment of acute portal-systemic encephalopathy. A controlled, double-blind clinical trial. *Am J Dig Dis* 1978; 23(5):398-406.
- (100) Conn HO. Trailmaking and number-connection tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy. *Am J Dig Dis* 1977; 22(6):541-550.
- (101) Atzlesberger M. Hepatische Enzephalopathie "die hepatische Enzephalopathie beginnt wo die geregelte Entgiftungsfunktion der Leber endet". *Österreichische Pflegezeitschrift* 2005; 05:8-10.
- (102) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60(8):646-649.
- (103) Abenhardt W. Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie. *Fresenius Biotech Clinical Development*, 2001.
- (104) Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992; 117(3):215-220.

- (105) Wiest R, Schölmerich J. Aktuelle Diagnostik und Therapie des Aszites. Der Gastroenterologe 2008; 3(1):57-67.
- (106) Glueck T. [Spontaneous bacterial peritonitis]. Dtsch Med Wochenschr 2004; 129 Suppl 2:S99-101.
- (107) Dancygier H. Lebererkrankungen- 1x1 der Therapie: Medikamente richtig eingesetzt. Springer Verlag, 2004: 87.
- (108) wettstein m, kudlek c, Häussinger D. Spontan bakterielle Peritonitis, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. Deutsches Ärzteblatt 2000; 97(42):2789-2792.
- (109) Press AG, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. [Spontaneous bacterial peritonitis]. Z Gastroenterol 1992; 30(8):543-552.
- (110) Schlottmann K, Gelbmann C, Grune S, Lock G, Scholmerich J. [A new paracentesis needle for ascites and pleural effusion compared with the venous indwelling catheter. A prospective, randomized study]. Med Klin (Munich) 2001; 96(6):321-324.
- (111) Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. Deutsches Ärzteblatt 2007; 104(24):1752-1757.
- (112) Takemura Y, Osuga Y, Harada M et al. Concentration of adiponectin in peritoneal fluid is decreased in women with endometriosis. Am J Reprod Immunol 2005; 54(4):217-221.
- (113) Bedaiwy MA, Falcone T, Goldberg JM, Sharma RK, Nelson DR, Agarwal A. Peritoneal fluid leptin is associated with chronic pelvic pain but not infertility in endometriosis patients. Hum Reprod 2006; 21(3):788-791.
- (114) Matarese G, Alviggi C, Sanna V et al. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85(7):2483-2487.
- (115) Wertel I, Gogacz M, Polak G, Jakowicki J, Kotarski J. Leptin is not involved in the pathophysiology of endometriosis-related infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005; 119(2):206-209.
- (116) Mahutte NG, Matalliotakis IM, Goumenou AG, Vassiliadis S, Koumantakis GE, Arici A. Inverse correlation between peritoneal fluid leptin concentrations and the extent of endometriosis. Hum Reprod 2003; 18(6):1205-1209.
- (117) Giannini E, Romagnoli P, Tenconi GL et al. High ascitic fluid leptin levels in patients with decompensated liver cirrhosis and sterile ascites: relationship with TNF-alpha levels. Dig Dis Sci 2004; 49(2):275-280.
- (118) Hube F, Lietz U, Igel M et al. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. Horm Metab Res 1996; 28(12):690-693.
- (119) van H, V, Dicker A, Ryden M et al. Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. Diabetes 2002; 51(7):2029-2036.

- (120) Heimbürger O, Wang T, Lonnqvist F, Stenvinkel P. Peritoneal clearance of leptin in CAPD patients: impact of local insulin administration. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(3):723-727.
- (121) Tsujimoto Y, Shoji T, Tabata T et al. Leptin in peritoneal dialysate from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(5):832-838.
- (122) Rogers CQ, Ajmo JM, You M. Adiponectin and alcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life* 2008.
- (123) Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K et al. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16(9):1118-1125.
- (124) Musso G, Gambino R, Durazzo M et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42(5):1175-1183.
- (125) Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(3):237-242.
- (126) Chuang JH, Wang PW, Tai MH. An adipocentric view of liver fibrosis and cirrhosis. *Chang Gung Med J* 2004; 27(12):855-868.
- (127) Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(22):1688-1694.
- (128) Sher DJ, Oh WK, Jacobus S, Regan MM, Lee GS, Mantzoros C. Relationship between serum adiponectin and prostate cancer grade. *Prostate* 2008; 68(14):1592-1598.
- (129) Patel JV, Abraheem A, Dotsenko O et al. Circulating serum adiponectin levels in patients with coronary artery disease: relationship to atherosclerotic burden and cardiac function. *J Intern Med* 2008.
- (130) Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Garcia-Unzueta MT et al. High-grade inflammation, circulating adiponectin concentrations and cardiovascular risk factors in severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(4):596-603.
- (131) Takemura Y, Walsh K, Ouchi N. Adiponectin and cardiovascular inflammatory responses. *Curr Atheroscler Rep* 2007; 9(3):238-243.
- (132) Jarrar MH, Baranova A, Collantes R et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(5):412-421.
- (133) Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9(5):279-284.
- (134) Yagmur E, Trautwein C, Gressner AM, Tacke F. Resistin serum levels are associated with insulin resistance, disease severity, clinical complications, and prognosis in patients with chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(6):1244-1252.

- (135) Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E et al. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43(9):1128-1136.
- (136) Greco AV, Mingrone G, Benedetti G, Capristo E, Tataranni PA, Gasbarrini G. Daily energy and substrate metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27(2):346-350.
- (137) Bolukbas FF, Bolukbas C, Horoz M et al. Child-Pugh classification dependent alterations in serum leptin levels among cirrhotic patients: a case controlled study. *BMC Gastroenterol* 2004; 4:23.
- (138) Henriksen JH, Holst JJ, Moller S, Brinch K, Bendtsen F. Increased circulating leptin in alcoholic cirrhosis: relation to release and disposal. *Hepatology* 1999; 29(6):1818-1824.
- (139) McCullough AJ, Bugianesi E, Marchesini G, Kalhan SC. Gender-dependent alterations in serum leptin in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1998; 115(4):947-953.
- (140) Shimizu H, Kakizaki S, Tsuchiya T et al. An increase of circulating leptin in patients with liver cirrhosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22(12):1234-1238.
- (141) Buyukberber M, Koruk M, Savas MC et al. Leptin levels in the differential diagnosis between benign and malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2007; 13(3):398-402.
- (142) Wang YY, Lin SY. Leptin in relation to hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Horm Res* 2003; 60(4):185-190.
- (143) Ribatti D, Belloni AS, Nico B, Di CM, Crivellato E, Vacca A. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides* 2008; 29(9):1596-1602.
- (144) Wang SN, Chuang SC, Yeh YT et al. Potential prognostic value of leptin receptor in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2006; 59(12):1267-1271.
- (145) Hoda MR, Popken G. Mitogenic and anti-apoptotic actions of adipocyte-derived hormone leptin in prostate cancer cells. *BJU Int* 2008; 102(3):383-388.
- (146) Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H et al. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res* 2004; 118(1):71-82.
- (147) Fava G, Alpini G, Rychlicki C et al. Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth. *Cancer Res* 2008; 68(16):6752-6761.
- (148) Jaffe T, Schwartz B. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Int J Cancer* 2008.
- (149) Sher DJ, Oh WK, Jacobus S, Regan MM, Lee GS, Mantzoros C. Relationship between serum adiponectin and prostate cancer grade. *Prostate* 2008; 68(14):1592-1598.
- (150) Chen DC, Chung YF, Yeh YT et al. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Lett* 2006; 237(1):109-114.

- (151) Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3):1102-1107.
- (152) Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2003; 9(15):5699-5704.
- (153) Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N et al. Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(3):993-997.
- (154) Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Hiramatsu T, Hatano K, Nagawa H. Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1):466-472.
- (155) Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(22):1688-1694.
- (156) Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(3):s858-s866.
- (157) Kelesidis I, Kelesidis T, Mantzoros CS. Adiponectin and cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2006; 94(9):1221-1225.
- (158) Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis* 2007; 11(1):191-1xi.
- (159) Ma H, Gomez V, Lu L, Yang X, Wu X, Xiao SY. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008.
- (160) Adachi Y, Takeuchi T, Sonobe H, Ohtsuki Y. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch* 2006; 448(3):311-318.
- (161) Otero M, Lago R, Gomez R et al. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(9):1198-1201.
- (162) Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3(12):716-724.
- (163) Kolonko A, Chudek J, Wiecek A. Concentration of adipokines in peritoneal effluent: a new marker of acute peritonitis in peritoneal dialysis patients? *Perit Dial Int* 2008; 28(5):527-532.
- (164) Pini M, Gove ME, Sennello JA, van Baal JW, Chan L, Fantuzzi G. Role and regulation of adipokines during zymosan-induced peritoneal inflammation in mice. *Endocrinology* 2008; 149(8):4080-4085.

V. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Reiner Wiest für die tatkräftige Unterstützung und Betreuung der Arbeit bedanken. Vielen Dank für die intensive Hilfe und Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Schäffler möchte ich für die fachliche Unterstützung, für die einfache und schnelle Kommunikation bei anstehenden Fragen und Problemen und die Bereitstellung der Labormaterialien bedanken.

Herrn PD. Dr. Hellerbrand möchte ich für die fachlichen Hinweise und Ratschläge, der ausdauernden Kommunikation bei Fragen und Problemen und der Erlernung von Labortechniken danken.

Im Rahmen der klinischen Probenasservierung und der Kommunikation auf Station sind in besonderem Maße Frau Dr. Viktoria Guralnik, Frau Dr. Sabine Thiel, Frau Margarita Bala, Frau Dr. Ursula Hempel, Frau Dr. Christine Dierkes, Frau Dr. Stefanie Lang, Frau Dr. Judith Maier, Herr Dr. Lino Teichmann (alle Innere Medizin I), Herr Matthias Hautmann (Strahlentherapie) und Herr Dr. Jochen Pfister (Hämatologie/Onkologie) hervorzuheben. Ich möchte mich bei den Genannten und allen anderen involvierten Ärzten und Mitarbeitern des Pflegepersonals und des Casemanagements für die freundliche und ausdauernde Unterstützung bei der Suche nach Studienteilnehmern und deren klinischer Charakterisierung bedanken.

Bei Frau Andrea Kopp und Frau Kerstin Winkler bedanke ich mich recht herzlich für die fachlichen Hilfestellungen im Rahmen der ELISA Analyse.

Bei Frau Cornelia Elser und Frau Marina Fink bedanke ich mich für die Erlernung von Labortechniken und die Probenverwaltung.

Ebenso gebührt allen Patienten und Mitwirkenden an der Studie ein ganz besonderer Dank.

Einen herzlichen Dank möchte ich meiner Familie für die persönliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit und meinem Studium aussprechen.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHES

Name	<u>Franz</u> Andreas Leidl
Geburtsdatum	01.04.1983
Geburtsort	Neumarkt i.d. OPf.



AUSBILDUNG

Schulbildung	1989 - 1993	Grundschule Wolfstein
	1993 - 2002	Willibald-Gluck-Gymnasium, 07/2002 - Abitur (Abschluss 1,3)
Studium	2003 - 2005	Vorklinikum, 10/2005 - 1. Staatsexamen (Abschluss 1,5)
	2005 - 2009	Klinischer Abschnitt, 12/2009 - 2. Staatsexamen (Abschluss 1,5)

KLINISCHE TÄTIGKEIT

Pflege-Krankenhaushilfe	1998 - 2000	Sozialprojekt KH-Hilfe am Klinikum Neumarkt Innere Medizin I
Zivildienst Chirurgie	2002 - 2003	Zivildienst Pflege Uniklinikum Regensburg Herz-Thorax-
Famulaturen	02-03/2006	Famulatur Orthopädie/Unfallchirurgie Klinikum Neumarkt
	03-04/2006	Famulatur Neurologie Uniklinikum Regensburg
	09-10/2006	Famulatur Psychiatrie Sanitätsspital Bruneck/ <i>Italien</i>
	03-04/2007	Famulatur Gastroenterologie Uniklinikum Chicago/ <i>USA</i>
	03-04/2008	Famulatur „General care“ Krankenhaus Shisong/ <i>Kamerun</i>
Praktisches Jahr	2008	1. Tertial Innere Medizin Uniklinikum Regensburg
	2008/2009	2. Tertial Neurologie Uniklinikum Basel/ <i>Schweiz</i>
	2009	3. Tertial Chirurgie Uniklinikum San Diego/ <i>USA</i>

WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER

Studiendekanat Vorklinikum	2005 - 2009	Anstellung bei Frau Prof. Baumann
Makroskopische Anatomie	2005 + 2006	Anstellung bei Herrn Prof. Wrobel und Herrn Prof. Tamm
Mikroskopische Anatomie	2006 + 2007	Anstellung bei Herrn Prof. Witzgall
Untersuchungskurs KuK	2007 + 2008	Anstellung bei Herrn Prof. Schölmerich/Herrn Prof. Jilg

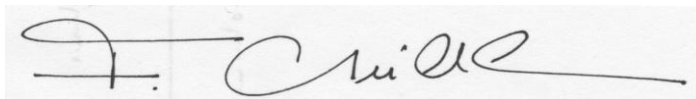
ERNENNUNG

Kultusministerium Bayern	2000	1. Preis Landeswettbewerb Geschichte
Bayerischer Leichtathletikverband	2003	Bayerischer Meister 400m Herren
Bayerischer Leichtathletikverband Herren	2003	1. Platz Bayerische Bestenliste 400m
Deutscher Leichtathletikverband	2002-2004	Kadermitglied
Regensburger Sportlerehrung	2002-2004	Sportlerschale gez. OB H. Schaidinger
Studienstiftung des Deutschen Volkes	2006	Mitglied auf Lebenszeit
Max-Weber-Programm Bayern	2007	Mitglied auf Lebenszeit

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

Süddeutsche Zeitung	2000 - 2002	Promotionsteam
Abacusanachhilfeinstitut Altdorf	2001 - 2002	Nachhilfe Hauptschule und Gymnasium
Firma Pfeiderer Neumarkt i.d.OPf	2001	Herstellung von Trägermaterialien
Firma Wodedo Neumarkt i.d.OPf	2002	Musterdekorverwaltung
Forsa Meinungsforschungsinstitut Hochrechnung von RTL	2003 + 2005	Wahlhelfer Bayerische Landtagswahl und Bundestagswahl
Politischer Arbeitskreis Humanmedizin München	2006-2009	Mitglied und im Vorsitz Arbeitskreis

Mit freundlichen Grüßen,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Leidl', on a light-colored background.

F. Leidl